

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**



**Regulación del factor de transcripción Nrf2**

**por la glucógeno sintasa quinasa 3**

**PATRICIA P. RADA LLANO**

**Madrid, 2012**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Regulación del factor de transcripción Nrf2**

**por la glucógeno sintasa quinasa 3**

Memoria de la Tesis para optar al grado de Doctor  
presentada por la Licenciada en Bioquímica

**PATRICIA P. RADA LLANO**

Directores de la Tesis:

**Dr. ANTONIO CUADRADO PASTOR**

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

**Dra. ANA ISABEL ROJO SANCHÍS**

Doctora en Bioquímica y Biología Molecular

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Albertos Sols”

UAM-CSIC







Antonio Cuadrado Pastor, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por Patricia P. Rada Llano, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, para optar al grado de Doctor, bajo el título: “Regulación del factor de transcripción Nrf2 por la glucógeno sintasa quinasa 3”, se ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

Considero que este estudio experimental es satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, expido el presente certificado en Madrid, a 4 de Mayo de 2012,

Fdo: Antonio Cuadrado Pastor

Catedrático de Universidad

Departamento de Bioquímica e

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid.





Ana Isabel Rojo Sanchís, Doctora en Bioquímica por el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por Patricia P. Rada Llano, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, para optar al grado de Doctor, bajo el título: “Regulación del factor de transcripción Nrf2 por la glucógeno sintasa quinasa 3”, se ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

Considero que este estudio experimental es satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, expido el presente certificado en Madrid, a 4 de Mayo de 2012,

Fdo: Ana Isabel Rojo Sanchís

Doctora en Bioquímica

Departamento de Bioquímica

Universidad Autónoma de Madrid.



Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (UAM-CSIC) gracias a una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación y con subvención del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2007-62646 y SAF2010-18722).



*"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad".*

*Albert Einstein*

*"Un científico en su laboratorio no es solamente un técnico, es también un niño a quien los fenómenos naturales impresionan como un cuento de hadas. Debemos ser capaces de comunicar al mundo esta manera de percibir la ciencia, en lugar de permitir que se crea que el progreso científico se reduce a mecanismos, máquinas, engranajes, que también por otra parte poseen su propia belleza".*

*"No hay que olvidar que cuando se descubrió el radio, nadie sabía que resultaría útil en los hospitales. El trabajo era ciencia pura. Y esto es una prueba de que el trabajo científico no debe considerarse desde el punto de vista de la utilidad directa de la misma. Se debe hacer por sí mismo, por la belleza de la ciencia y, a continuación, siempre existe la posibilidad de que un descubrimiento científico puede llegar a ser, como el radio, un beneficio para la humanidad".*

*Marie Curie*





*A mis padres, José María y Pilar,  
a mi hermana Rebeca  
y a Juan Antonio*



## ***AGRADECIMIENTOS***



## Agradecimientos

---

La verdad es que son muchas personas a las que tengo que agradecerles el apoyo y el cariño que me han ofrecido a lo largo de este tiempo. Aquí va el monólogo:

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Antonio Cuadrado por haberme ofrecido la oportunidad de formar parte de su equipo desde el día que vine a hacer la entrevista para la Bioquímica Experimental Avanzada allá por 2006. Quiero darle las gracias por todo lo que me ha enseñado, por la paciencia, y sobre todo, por la confianza que ha depositado en mí durante estos años. ¡Gracias por todo!

Por supuesto me gustaría darle las gracias a la Dra. Ana Isabel Rojo Sanchís. Ella es mi co-directora de Tesis pero es más mi Anita, mi Mamá Pato. Gracias por asumir la responsabilidad de criar un patito. Quiero agradecerte tu apoyo incondicional tanto dentro del laboratorio como fuera, gracias por las charlas, los consuelos, las risas, mis monólogos. Gracias por tu profesionalidad, por ser una de mis referencias aquí, por enseñarme a relativizar muchas veces los problemas para salir de ellos. ¡Somos el *Dream Team* y podemos con todo! ¡Gracias por ser mi amiga y por quererme tanto!

Quiero agradecer también el apoyo que nos han ofrecido nuestros colaboradores en Dundee y en París. Quiero agradecer al Dr. John D. Hayes, al Dr. Mike McMahon y a Sudhir Chowdhry por su inestimable colaboración y por ayudarme en mi primera estancia, siempre difícil. Quiero agradecer también al Dr. Gidas Bertho, a la Dra. Nathalie Evrard-Todeschi y a Axelle Cotte por ayudarnos con lo que al principio parecía un sueño de locos: “¿Modelar *Nrf2* y  $\beta$ -TrCP? ¿Tú crees que eso se puede hacer?”. Gracias por la experiencia enriquecedora tanto laboral como personalmente. Pero sobre todo, gracias a todos por el esfuerzo conjunto para sacar adelante estos proyectos que hoy en día son una realidad.

Quiero mucho a la gente del laboratorio, son mi segunda familia, pasamos muchas horas juntos y tengo muchísima suerte de haberlos conocido a todos.

Nadia, ay mi argentina invertida... Me alegro muchísimo de haberte conocido y de haber compartido taaantos momentos, tantas alegrías (¿verdad, Pancita?). Muchas gracias por ofrecerme tu compañerismo y tu amistad, por compartir primeras experiencias: nuestro primer congreso a Valencia o nuestro primer viaje a los *estates* ¿¿¡¡recuerdas los *outlets* de Washington!??? Para no olvidarlos...

Isabel llegó un día con su “hola, soy Isabel” tan característico y del que todavía hoy me rió con ella. Muchas gracias por ser mi amiga, por preocuparte, por las charletas vespertinas, por compartir los buenos, pero también los malos momentos. La Dra. Isabel Lastres-Becker es muy profesional, no hay duda, pero -siempre hay un pero- tiene que dejar de superarse con las tartas... eso o montamos ya el negocio. Yo, personalmente, lo veo.

El último de los supervivientes, nuestro Ángel, al que llamaremos cariñosamente Ang. Sobre todo quiero agradecerle su risa. Hemos compartido muchos momentos de risa pero también cabreos e indignación, todo nos hace fuertes, Ang. ¡Suerte también con tu Tesis y ánimo!

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a nuestras técnicas Rosana y Johanna. Son unas auténticas profesionales, pero lo que es más importante, son unas personas excelentes, cariñosas, amigas, apoyos y son muy luchadoras. ¡Las quiero un montón y les deseo mucha suerte!

Mis agradecimientos también a la Dra. Rosa Sagarra por pasar buenos ratos con nosotros y por dejarnos un huequito en su laboratorio cuando lo necesitamos. Por último quiero acordarme de todos los niños que han pasado por el labo y que siempre han tenido buenas palabras para mí. Gracias a Aída, César, Irene, Néstor, Verónica y Zaira.

En este momento, quiero acordarme de mis amigos. Su compañía es muy importante para mí. Quiero agradecerle el apoyo incondicional a mis químicas María, Alba y Vanesa, alias *las mivis*, porque ellas entienden lo que significa luchar por esto, dejarse la piel, las lágrimas -buenas y malas- y la felicidad cuando sale bien. Gracias también a mis amigos los mostoleños, Patricia, Sergio, Dani y Nieves, y a los madrileños, Mónica y David. Gracias también a los maridos de Ana y Nadia, Óscar y Augusto, por ofrecerme su cariño y una mano cuando la he necesitado. Un agradecimiento cargado de mala onda para el experto en ello Samir, por compartir mi experiencia en París y llevarme a castillos tan bonitos como el de Pierrefonds.

Quiero dejar para el final a los que más tengo que agradecer. Mi familia. Quiero darles las gracias a mis padres José María y Pilar, porque sin ellos, nada de esto habría sido posible. Por su esfuerzo, por dejarse la vida trabajando para que sus hijas pudieran conseguirlo. Por ser los mejores padres, por los consejos, por la sinceridad para corregirnos, por su fortaleza en los malos momentos. No tengo ni tendré suficientes palabras para agradecerles por todo, porque ellos son mi vida.

Infinitas gracias a mi hermana Rebeca. Porque es la persona más luchadora que he conocido por superar todo lo que la vida injustamente le ha puesto en el camino. Tiene mala leche, es más seca, pero es la mejor. Ella es la que nos ha dado la gran lección a todos y por ello todos hemos aprendido de ella. Gracias a Adri, por ser mi amigo petardo, pero, sobre todo, por cuidarla. Te llevas un diamante -en bruto- pero diamante.

Un recuerdo para Irene, quien supo ayudar a mi hermana a ganar una batalla, mientras que ella perdió una guerra. Y un agradecimiento sincero para el personal del Hospital de Getafe, especialmente, para la Dra. Holguín Holgado.

Le dedico también este trabajo a mis abuelos, Gloria, Piedad y José María. Sé que mi abuela Piedad estaría orgullosa si estuviera aquí, tanto como lo está mi abuelo José María. Me alegro tanto de que él pueda compartir esto con 93 añazos.

Gracias a Juanan, mi “arrejuntado”, por compartir tu vida conmigo. Gracias por estar ahí, por darme buenos momentos, por apoyarme en los malos, por sacrificarte por mí, por ceder tu tiempo para que yo pueda cumplir mis objetivos. Por decirme “¡mira! palabras que un buen novio debe saber: beta-TrCP, maxis, minis, fosforilación, Nrf2, ubiquitina”... aunque no sepas lo que significa, sólo para que esboce una sonrisa. Gracias por acompañarme a Londres, gracias por tomar un tren durante 13 horas para venir a París a verme. Gracias por estos cuatro años de felicidad infinita.

Gracias a los que no pude nombrar pero sé que estáis ahí. Gracias a todos.

## ***SUMMARY/RESUMEN***





## Summary

---

Defense against oxidative stress is executed by an antioxidant system that is tightly controlled by the transcription factor Nrf2. Nrf2 is the master regulator of a genetic program termed the phase II response that controls redox homeostasis and participates in multiple aspects of physiology and pathology. Classical regulation of Nrf2 involves redox-sensitive degradation by the E3 ubiquitin ligase Keap1/Cul3. However, Nrf2 is controlled by other mechanisms that have not yet been elucidated. In this Thesis, we described a novel mechanism that involves glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) in the stabilization of Nrf2 by a Keap1-independent pathway implicating the E3 ubiquitin ligase SCF/ $\beta$ -TrCP.

Taking nordihydroguaiaretic acid (NDGA) as a prototype chemopreventive agent, we show that this compound activates PI3K/Akt and the MAP kinases ERK1/2, p38, and JNK, promoting the stabilization of Nrf2. We also show that these pathways cause inhibitory phosphorylation of GSK-3 $\beta$  at Ser9 and at Thr390. These results identify GSK-3 $\beta$  as an integrator of several signaling pathways.

We found that GSK-3 phosphorylates a group of Ser residues within the Neh6 domain of Nrf2 that overlap with an SCF/ $\beta$ -TrCP destruction motif (DSGIS). Phosphorylation of this Ser cluster stimulated the degradation of Nrf2 by a SCF/ $\beta$ -TrCP complex. 2D-Gel electrophoresis and site directed mutagenesis allowed us to identify two serines that are phosphorylated by GSK-3 $\beta$  in the DSGIS sequence. In addition, Nuclear Magnetic Resonance studies defined key hydrophilic and hydrophobic interactions of this phospho-sequence involved in docking to  $\beta$ -TrCP.

Mice with a conditional depletion of neuronal GSK-3 $\beta$  exhibited in hippocampus increased levels of Nrf2 and phase II gene products as well as increased levels of reduced glutathione and lower levels of malondialdehyde and carbonylated proteins. Moreover, GSK-3 inhibitors induced an increase of Nrf2 and its target genes and prevented excitotoxic neuronal death mediated by kainate in hippocampal slices.

This Thesis establishes the structural parameters for the interaction of Nrf2 with the GSK-3/ $\beta$ -TrCP axis and its functional relevance in the regulation of Nrf2 by the signaling pathways that impinge on GSK-3.

Los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo están gobernados por un sistema antioxidante que está estrechamente controlado por el factor de transcripción Nrf2. Así, Nrf2 es el regulador maestro de un programa genético denominado respuesta de fase II que controla la homeostasis redox celular y participa en múltiples aspectos fisiológicos y patológicos. La regulación de Nrf2 supone su degradación sensible a estrés oxidativo a través de la E3 ubiquitina ligasa Keap1/Cul3. Sin embargo, Nrf2 es regulado a través de otros mecanismos que aún no han sido descritos. En esta Tesis describimos que la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) regula la estabilización de Nrf2 por una vía independiente de Keap1 que implica a la E3 ubiquitina ligasa SCF/ $\beta$ -TrCP.

Utilizando el ácido nordihidroguayarático (NDGA) como un agente quimiopreventivo modelo, mostramos que este compuesto activa las vías de señalización de PI3K/Akt y de las MAP quinasas ERK1/2, p38 y JNK, promoviendo la estabilización de Nrf2. Además, mostramos que estas vías son las responsables de la fosforilación inhibitoria de GSK-3 $\beta$  en los residuos Ser9 y Thr390. Estos resultados identifican a GSK-3 $\beta$  como un integrador de varias vías de señalización.

Mediante el análisis de la secuencia de Nrf2, hemos encontrado que GSK-3 fosforila un grupo de residuos de Ser incluidos en el dominio Neh6 de Nrf2 que solapan con un dominio de destrucción por  $\beta$ -TrCP (DSGIS). La fosforilación de este grupo de Ser acelera la degradación de Nrf2 a través del complejo SCF/ $\beta$ -TrCP. Gracias al análisis de los geles 2D-PAGE y a la mutagénesis dirigida sobre estos residuos, identificamos dos serinas que están fosforiladas por GSK-3 $\beta$  en el motivo DSGIS. Además, mediante estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), definimos las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas claves para la formación del complejo Nrf2/ $\beta$ -TrCP.

Neuronas de hipocampo de ratones con una depleción condicional de GSK-3 $\beta$  exhibieron niveles aumentados de Nrf2 y de enzimas de fase II así como niveles elevados de glutatión reducido y niveles reducidos de malonaldehído y proteínas carboniladas. Asimismo, la inhibición farmacológica de GSK-3 incrementó los niveles de Nrf2 y de sus genes diana y atenuó la muerte neuronal excitotóxica mediada por kainato.

Esta Tesis establece los parámetros estructurales para la interacción de Nrf2 con el eje GSK-3/ $\beta$ -TrCP y su relevancia funcional en la regulación de Nrf2 a través de vías de señalización que convergen en GSK-3.

## ***ÍNDICE DE CONTENIDOS***



Índice de contenidos

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>15</b>
<b>SUMMARY/RESUMEN .....</b>	<b>19</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>23</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>31</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>1 El factor de transcripción Nrf2. ....</b>	<b>37</b>
1.1 Estructura de Nrf2.....	39
1.2 Regulación de Nrf2.....	40
1.2.1 La vía clásica de Keap1.....	40
1.2.2 La regulación de Nrf2 a través de vías de señalización.....	42
1.3 Nrf2 como diana farmacológica de patologías relacionadas con estrés oxidativo..	45
1.3.1 Inductores de Nrf2. ....	45
1.3.2 Regulación farmacológica de Nrf2 en un modelo de excitotoxicidad inducida por kainato.....	48
<b>2 Glucógeno sintasa quinasa 3.....</b>	<b>49</b>
2.1 GSK-3 $\alpha$ y GSK-3 $\beta$ .....	49
2.2 Regulación de GSK-3.....	49
2.3 Funciones celulares controladas por GSK-3.....	51
<b>3 La degradación de Nrf2 por el sistema ubiquitina-proteasoma como mecanismo de regulación.....</b>	<b>53</b>
3.1 Funcionamiento del sistema ubiquitina-proteasoma. ....	53
3.2 Clasificación de los complejos de degradación.....	54
3.2.1 E3 ligasa Cul3/Keap1.....	54
3.2.2 El complejo SCF/ $\beta$ -TrCP (Skp1-Cullin1-proteínas Fbox/ $\beta$ -TrCP).....	55
<b>OBJETIVOS/OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>Materiales.....</b>	<b>63</b>
<b>1 Productos.....</b>	<b>63</b>
1.1 Cultivos celulares.....	63
1.2 Manipulación y obtención del DNA.....	63

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.3	<i>Electroforesis monodimensional y bidimensional de proteínas, transferencia e inmunodetección.....</i>	63
1.4	<i>Isótopos.....</i>	63
1.5	<i>Extracción de RNA y RT-PCR.....</i>	63
1.6	<i>Determinación de actividad luciferasa.....</i>	64
1.7	<i>Determinación de las vidas medias de proteínas.....</i>	64
1.8	<i>Determinación de actividad lactato deshidrogenasa.....</i>	64
<b>2</b>	<b><i>Anticuerpos.....</i></b>	<b>64</b>
2.1	<i>Anticuerpos primarios.....</i>	64
2.2	<i>Anticuerpos secundarios.....</i>	67
<b>3</b>	<b><i>Plásmidos.....</i></b>	<b>67</b>
3.1	<i>Plásmidos de Nrf2.....</i>	67
3.2	<i>Plásmidos de GSK-3<math>\beta</math>.....</i>	70
3.3	<i>Plásmidos de <math>\beta</math>-TrCP.....</i>	70
3.4	<i>Plásmidos de Keap1.....</i>	72
3.5	<i>Otros plásmidos.....</i>	72
<b>4</b>	<b><i>Péptidos.....</i></b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b><i>Tampones y soluciones.....</i></b>	<b>73</b>
5.1	<i>Tampones generales.....</i>	73
5.2	<i>Tampón de carga para electroforesis SDS-PAGE 5X.....</i>	73
5.3	<i>Tampón TTBS.....</i>	73
5.4	<i>Tampón de lisis.....</i>	73
5.5	<i>Tampones de carga de DNA.....</i>	73
<b>6</b>	<b><i>Estirpes bacterianas.....</i></b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b><i>Líneas celulares.....</i></b>	<b>74</b>
7.1	<i>HEK293T.....</i>	74
7.2	<i>Fibroblastos embrionarios procedentes de ratones deficientes en Keap1 (Keap1 <math>^{-/-}</math>) y fibroblastos embrionarios procedentes de ratones silvestres (Keap1 <math>^{+/+}</math>).....</i>	74
7.3	<i>Fibroblastos embrionarios procedentes de ratones deficientes en Nrf2 (Nrf2 <math>^{-/-}</math>) y fibroblastos embrionarios procedentes de ratones silvestres (Nrf2 <math>^{+/+}</math>).....</i>	74
7.4	<i>Neuro2A (N2A).....</i>	74
<b>8</b>	<b><i>Animales.....</i></b>	<b>74</b>
8.1	<i>Ratones macho Nrf2<math>^{-/-}</math>/C57BL6J y sus correspondientes ratones silvestres, Nrf2<math>^{+/+}</math>/C57BL6J.....</i>	74
8.2	<i>Ratones deficientes en GSK-3<math>\beta</math> (+Cre) y sus controles (-Cre).....</i>	75

<b>Métodos .....</b>	<b>75</b>
<b>1 Cultivos celulares. ....</b>	<b>75</b>
<b>2 Transfecciones transitorias.....</b>	<b>75</b>
<b>3 Preparación de lisados celulares. ....</b>	<b>76</b>
<b>4 Electroforesis e inmunodetección.....</b>	<b>76</b>
<b>5 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE).....</b>	<b>76</b>
<b>6 Co-Inmunoprecipitaciones. ....</b>	<b>77</b>
<b>7 Ensayos de fosforilación in vitro. ....</b>	<b>77</b>
<b>8 Ensayos de ubiquitinación. ....</b>	<b>78</b>
8.1 Ensayos de ubiquitinación in vitro.....	78
8.2 Ensayos de ubiquitanción in vivo.....	78
<b>9 Silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia.....</b>	<b>79</b>
<b>10 Análisis de la estabilidad de Nrf2 mediante marcaje con <sup>35</sup>S.....</b>	<b>80</b>
<b>11 Determinación de RNA mensajero mediante PCR cuantitativa a tiempo real. ..</b>	<b>81</b>
<b>12 Ensayos de actividad luciferasa. ....</b>	<b>81</b>
<b>13 Ensayo de actividad lactato deshidrogenasa.....</b>	<b>82</b>
<b>14 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. ....</b>	<b>82</b>
<b>15 Modelado molecular de la interacción Nrf2-β-TrCP. ....</b>	<b>84</b>
<b>16 Determinación de los niveles de glutatión reducido y oxidado.....</b>	<b>85</b>
<b>17 Determinación de los niveles de proteínas oxidadas.....</b>	<b>85</b>
<b>18 Determinación de los niveles de peroxidación lipídica.....</b>	<b>86</b>
<b>19 Obtención de las secciones de hipocampo y medición de estrés oxidativo y de muerte celular.....</b>	<b>86</b>
<b>20 Cuantificación de imágenes y análisis estadístico. ....</b>	<b>87</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
<b>1 El ácido nordihidroguayarático (NDGA) activa a Nrf2 mediante la inhibición de la quinasa GSK-3.....</b>	<b>91</b>
1.1 El NDGA activa el eje Nrf2/HO-1 por un mecanismo independiente de Keap1.....	91
1.2 Vías de señalización activadas por NDGA.....	92

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.3	Las vías de señalización activadas por NDGA convergen a nivel de la inhibición de GSK-3.....	93
1.4	La inhibición de GSK-3 participa en la protección por NDGA frente a muerte celular inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	96
1.5	Los inhibidores de GSK-3 cooperan con la tert-butilhidroquinona (tBHQ) y el sulforafano (SFN) en la inducción de Nrf2.....	97
<b>2</b>	<b>Caracterización de la degradación de Nrf2 mediada por GSK-3/β-TrCP.....</b>	<b>99</b>
2.1	GSK-3 regula la estabilidad de Nrf2 por un mecanismo independiente de Keap1. ..	99
2.2	GSK-3 fosforila varias regiones de Nrf2.....	103
2.3	El sistema SCF/β-TrCP degrada Nrf2.....	104
2.4	GSK-3β participa en la fosforilación de un grupo de serinas de Nrf2 dentro del dominio de destrucción por β-TrCP.....	106
2.5	El mutante de Nrf2 que carece del grupo de seis serinas es insensible a la degradación inducida por el eje GSK-3/β-TrCP.....	109
<b>3</b>	<b>Análisis estructural del complejo de degradación Nrf2/β-TrCP por Resonancia Magnética Nuclear (RMN). .....</b>	<b>112</b>
3.1	El dominio Neh6 es responsable de la degradación de Nrf2 dependiente de β-TrCP.....	113
3.2	Identificación de los residuos de serina del dominio Neh6 que se fosforilan por GSK-3.....	115
3.3	Identificación por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de las fosfoserinas del dominio Neh6 que interaccionan con β-TrCP.....	118
3.3.1	Estudio de los péptidos 2P-hNrf2 y 4P-hNrf2 libres en solución.....	119
3.3.2	Estudio de la interacción de los péptidos 2P-hNrf2 y 4P-hNrf2 con β-TrCP.....	131
3.4	Modelado molecular de la interacción Nrf2/β-TrCP.....	136
3.5	Los residuos de serina localizados en el motivo DSGIS del dominio Neh6 son necesarios para la interacción entre Nrf2 y β-TrCP.....	140
<b>4</b>	<b>Relevancia funcional de la regulación de Nrf2 por GSK-3. ....</b>	<b>141</b>
4.1	Regulación de Nrf2 en ratones con una depleción condicional de GSK-3β en neuronas.....	141
4.2	Regulación de Nrf2 por GSK-3 en un modelo de excitotoxicidad inducida por kainato.....	144
	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>147</b>
<b>1</b>	<b>Modelo de degradación dual de Nrf2 mediado por GSK-3/β-TrCP y Keap1. ....</b>	<b>149</b>
<b>2</b>	<b>Caracterización del mecanismo molecular de degradación mediada por la vía de GSK-3/β-TrCP.....</b>	<b>154</b>



3	<i>Análisis estructural del complejo Nrf2/<math>\beta</math>-TrCP.....</i>	157
4	<i>Relevancia funcional de la regulación de Nrf2 por el eje GSK-3/<math>\beta</math>-TrCP.....</i>	160
5	<i>Observaciones finales y perspectivas futuras.....</i>	162
	<b>CONCLUSIONS/CONCLUSIONES.....</b>	165
	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	169
	<b>ANEXOS.....</b>	187



## ***ABREVIATURAS***



## Abreviaturas

---

**Akt:** También denominada proteína quinasa B (PKB). La nomenclatura se debe a que la quinasa fue aislada de un retrovirus transformante celular AKT8 (*acute transforming retrovirus*) procedente de un linfoma de células T de la cepa de ratones AKR.

**ARE:** Elementos de respuesta antioxidante (*Antioxidant response element*).

**BSA:** Albúmina sérica bovina (*Bovine serum albumin*).

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**CFP:** Proteína cian fluorescente (*Cyan fluorescent protein*).

**CK2:** Caseína quinasa 2.

**ECL:** Ensayo de detección por quimioluminiscencia (*Enhanced chemiluminescence*).

**EDTA:** Ácido etilendiaminetetraacético.

**EGFP:** Proteína verde fluorescente mejorada (*Enhanced green fluorescent protein*).

**ERK1/2:** Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2.

**EYFP:** Proteína amarilla fluorescente mejorada (*Enhanced yellow fluorescent protein*).

**FBS:** Suero fetal bovino (*Fetal bovine serum*).

**GCLC y GCLM:** Glutamato cisteína ligasa. Unidades catalítica y moduladora.

**GSH:** Glutación en su forma reducida.

**GSK-3:** Glucógeno sintasa quinasa 3.

**GSSG:** Glutación en su forma oxidada.

**GST:** Glutación S-transferasa.

**GPx:** Glutación peroxidasa.

**H<sub>2</sub>DCFDA:** 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato.

**HA:** Epítipo hemaglutinina (HA) del virus Influenza, compuesto por los siguientes aminoácidos: YPYDVPDYA.

**HEPES:** Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico.

**HO-1:** Hemo oxigenasa-1.

**JNK:** Quinasa del extremo NH<sub>2</sub> de c-Jun

**MAP quinasas:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos.

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero.

**NDGA:** Ácido nordihidroguayarático.

**NOESY:** Espectroscopía de efecto Overhauser nuclear (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*).

**NQO1:** NAD(P)H:quinona oxidoreductasa-1.

**PBS:** Tampón fosfato salino (*Phosphate buffer saline*).

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*).

## ABREVIATURAS

**PI3K:** Fosfatidil inositol 3 quinasa.

**PKC:** Proteína quinasa C.

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*).

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**RNS:** Especies reactivas de nitrógeno.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**SCF:** Skp1-Cullin1-proteínas Fbox.

**SDS:** Dodecilsulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*).

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (*Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*).

**SFN:** Sulforafano.

**tBHQ:** Tert-butilhidroquinona.

**TBS:** Tampón tris salino (*Tris buffered saline*).

**TDZD-8:** Tiadiazolidinona-8.

**TEMED:** N,N,N,N'-tetrametilendiamina.

**TOCSY:** Espectroscopía de correlación total (*Total Correlation Spectroscopy*).

**TRNOESY:** Espectroscopía de efecto Overhauser nuclear transferido (*Transferred Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*).

**TTBS:** Tampón tris salino con Tween-20 (*Tween-20-Tris buffered saline*).

## ***INTRODUCCIÓN***





## Introducción

---

### 1 El factor de transcripción Nrf2.

Como consecuencia del metabolismo aeróbico o de la biotransformación de compuestos xenobióticos, las células están sometidas constantemente a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en forma de anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y peróxidos orgánicos, y de especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ( $ONNO_2^-$ ). Por otra parte, estas especies reactivas participan en las vías de señalización en respuesta a los cambios del medio intra o extracelular (29, 74, 193, 216). También son importantes en la regulación de ciertos factores de transcripción (24). Sin embargo, su sobreproducción debida, por ejemplo, a factores ambientales como metales pesados, radiación ultravioleta, radiación ionizante, anoxia o hiperoxia (73) está relacionada con diferentes patologías como las enfermedades neurodegenerativas, diabetes, cáncer, etc. El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante celular para controlar sus niveles. Este desequilibrio modifica irreversiblemente las macromoléculas generando derivados no funcionales como 8-oxo-guanina en el DNA, peroxidación lipídica, nitración de proteínas, etc., y tiene un impacto importante en el organismo (29).

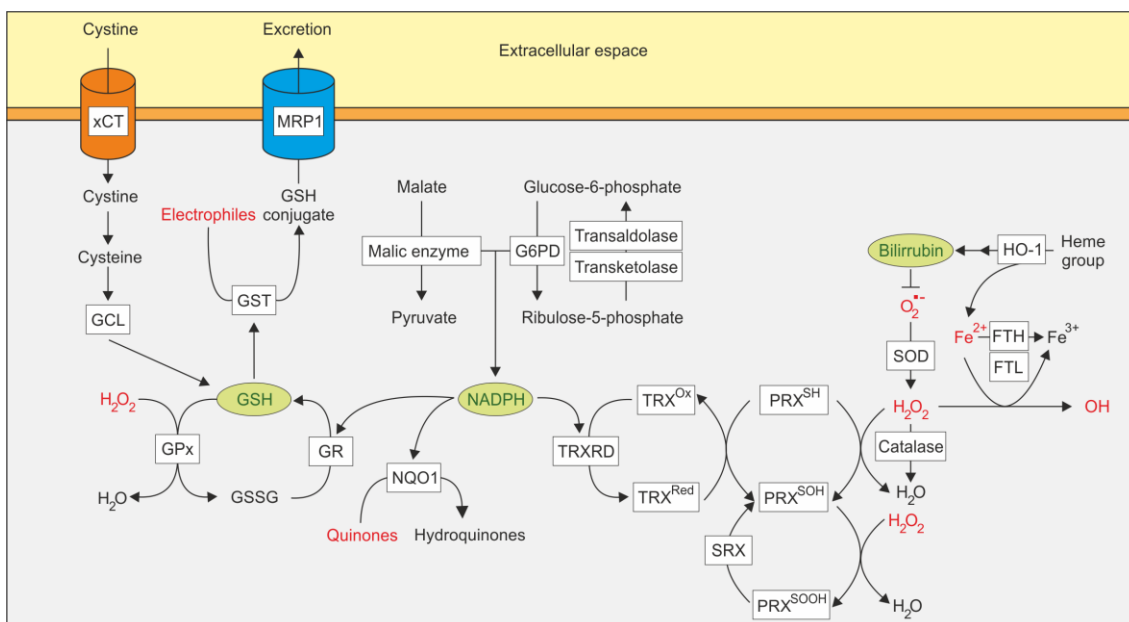
Para eliminar ROS y RNS, las células han desarrollado una maquinaria de detoxificación celular. Este mecanismo se divide en tres fases. La fase I está compuesta por enzimas, como el citocromo P450, que catalizan la monooxidación de estas especies para aumentar su polaridad. La fase II media la conjugación de los compuestos con glutatión, ácido glucurónico o sulfato (102). La fase III contiene varios transportadores para sacar estos productos de las células (152).

La fase II incluye además otro grupo de enzimas que participan en la detoxificación oxidativa, tales como hemo oxigenasa-1 (HO-1), NAD(P)H:quinona oxidorreductasa-1 (NQO1) y las enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión (glutatión S-transferasa (GST), glutamil-cisteína ligasa (GCL) y glutatión peroxidasa (GPx)) (Fig. 1). Varios grupos han analizado los promotores de los genes que codifican enzimas de fase II en busca de elementos de respuesta a agentes xenobióticos que activen su expresión. Las primeras evidencias sobre la existencia de estos *enhancers* se obtuvieron examinando el gen de la subunidad alfa de GST de rata, en cuyo promotor existían dos secuencias 5'-TGACAAAGC-3' que inicialmente se denominaron "*Ya subunit gene*", y que

## INTRODUCCIÓN

eran fundamentales para la expresión de este gen en presencia de tert-butilhidroquinona (tBHQ) (182). Posteriormente, se determinó la secuencia consenso 5'-TGACnnnGC-3', donde n representa cualquier nucleótido (181), que define lo que actualmente se conoce como Elemento de Respuesta Antioxidante (*Antioxidant Response Element*, ARE).

Dado que estos ARE se parecen a los elementos de reconocimiento de las proteínas Maf (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*) (MARE, 5'-TGCTGACTCAGCA-3'), varios grupos propusieron que los miembros del tipo b-zip (*basic-leucine zipper*, dominio de cremallera de leucinas) que pertenecen a la familia *cap 'n' collar* (CNC) podrían estar implicados en el control de la expresión de estos genes ARE. Entre estos factores de transcripción se encuentra la subunidad p45 de NF-E2 (*nuclear factor-erythroid 2*) (5) y Nrf (*NF-E2 p45-related factor*) 1, 2 y 3 (37, 121, 148). Venugopal y Jaiswal (211) demostraron que la sobreexpresión de Nrf1 y Nrf2 en células humanas HepG2 induce la expresión de los genes ARE de fase II en condiciones basales y tras el tratamiento con tBHQ. *In vivo*, la función transactivadora de Nrf2 fue analizada utilizando ratones deficientes de Nrf2 (39, 94, 143). Estos estudios demostraron el papel esencial de Nrf2 en la expresión de los genes de fase II en situación basal y tras el tratamiento con agentes xenobióticos. Además, los ratones deficientes en Nrf2 muestran una sensibilidad



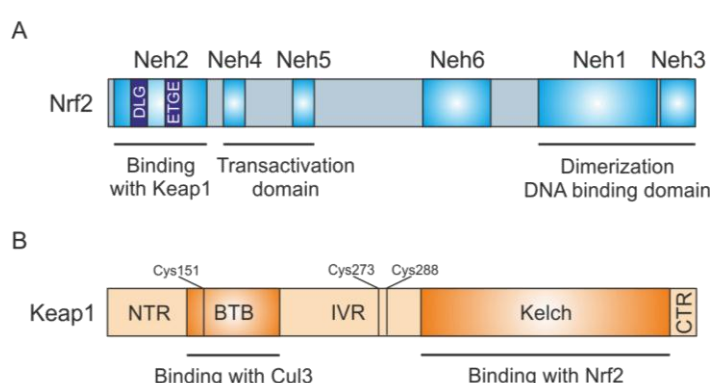
**Figure 1. Nrf2 regulates the expression of cytoprotective genes against electrophiles.** The boxes indicate gene products that have been shown to be regulated by electrophiles in an Nrf2-dependent manner. Small-molecule antioxidants are written in green letters and reactive intermediates in red. xCT: cystine-glutamate transporter; GCL: glutamate-cysteine ligase; G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione reductase; GSTs: glutathione S-transferases; HO-1: heme oxygenase-1; MRP1: multidrug resistance-associated protein 1; NQO1: NAD(P)H quinone oxidoreductase 1; PRX: peroxiredoxin; SOD: superoxide dismutase; SRX: sulfiredoxin; TRX: thioredoxin; TXNRD: thioredoxin reductase. This figure is modified from (97).

aumentada frente a la toxicidad provocada por diferentes compuestos como benzopirenos, humo de tabaco o neurotoxinas como 1-metil-4-fenil-(1,2,3,6)-tetrahidropiridina (MPTP) o ácido 3-nitropropiónico (26, 38, 41, 57, 92, 178-179). Estudios recientes utilizando modelos de inflamación por lipopolisacárido (LPS) indican que Nrf2 no sólo promueve la respuesta antioxidante sino que también actúa mediando la respuesta antiinflamatoria (93, 116, 133).

Hoy día, Nrf2 es considerado el regulador maestro de la homeostasis redox celular. Dada la implicación del estrés oxidativo en diversas patologías como cáncer, diabetes, inflamación crónica o enfermedades neurodegenerativas, el conocimiento de las vías de regulación de Nrf2 supone un avance fundamental para el tratamiento de estas enfermedades.

### 1.1 Estructura de Nrf2.

La proteína de Nrf2 contiene entre 586 y 605 aminoácidos según la especie, y se encuentra dividida en seis dominios funcionales (Fig. 2) denominados Neh1-6 (*Nrf2-ECH-homology*) (98). Neh1 contiene la cremallera de leucinas (b-zip) y la zona implicada en heterodimerización con proteínas de la familia *small Maf* (95, 113, 138). Neh2 funciona como un dominio regulador negativo de Nrf2. El sistema del doble híbrido en levaduras usando como cebo el dominio Neh2 permitió identificar a la proteína Keap1 como un represor de la actividad de Nrf2 (96). A través del dominio Neh3, Nrf2 se une al dominio de unión al ADN de la cromosoma-ATPasa/helicasa CHD6, que funciona como un co-activador transcripcional (156). Neh4 y Neh5 actúan sinérgicamente para unir otro co-activador



**Figure 2. Domain structures of Nrf2 and Keap1.** **A**, Nrf2 possesses six evolutionarily conserved domains called Neh1–6. Neh1 serves as the DNA binding and heterodimerization domain with small Maf proteins. Neh2 functions as a degron of Nrf2. The transactivation activity of Nrf2 lies in Neh4 and Neh5. These domains cooperatively bind CBP. Neh3 is reportedly required for Nrf2 transactivation activity via interaction with CHD6. **B**, In Keap1, shown are the positions of the N-terminal region (NTR), the BTB domain, the intervening region (IVR), the Kelch (DGR) domain and the C-terminal region (CTR), and the location of C151, C273 and C288. Keap1 dimerises through the BTB domain that is also the domain through which Keap1 binds to Cullin 3 (Cul3). The Kelch domain forms a 6-bladed  $\beta$ -propeller structure through which Keap1 interacts with the Neh2 domain of Nrf2.

## INTRODUCCIÓN

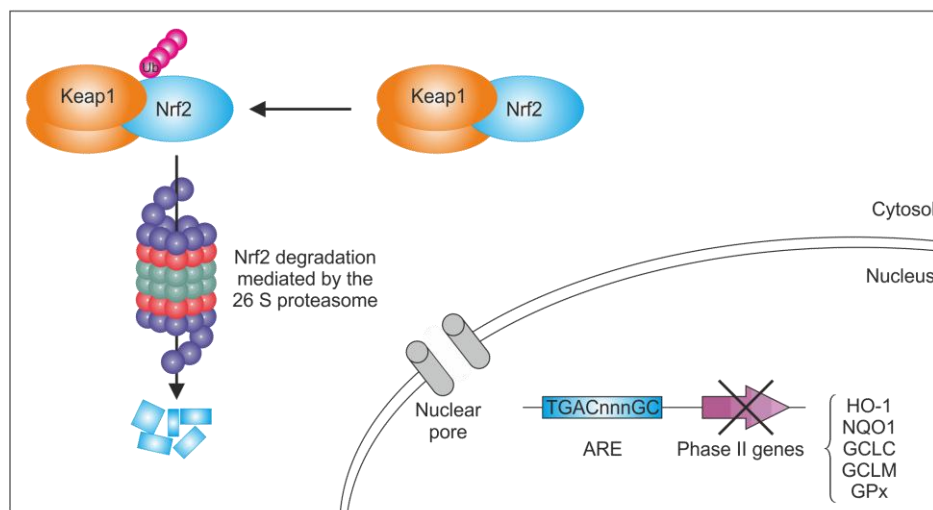
transcripcional, CBP (112). Se ha descrito que el dominio Neh6 está implicado en la regulación negativa de Nrf2 (145) y éste ha sido el objetivo de estudio en esta Tesis.

### 1.2 Regulación de Nrf2.

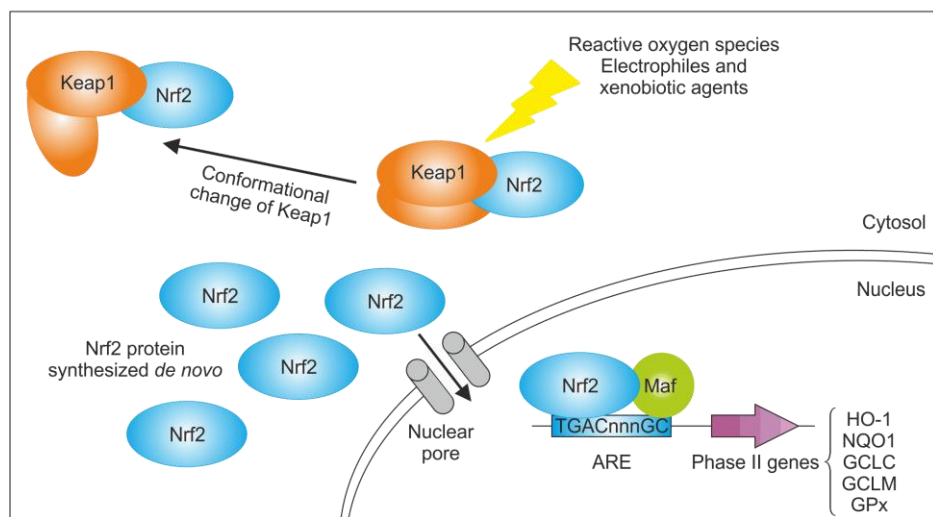
#### 1.2.1 La vía clásica de Keap1.

Nrf2 es regulado a nivel postraducciona por la E3-ligasa Keap1 (*Kelch-like ECH associated protein*) (8, 203). Bajo condiciones redox normales, Nrf2 se encuentra unido al homodímero de Keap1 en el citosol. Esta unión promueve su ubiquitinación y posterior

A. Non-stressed conditions.

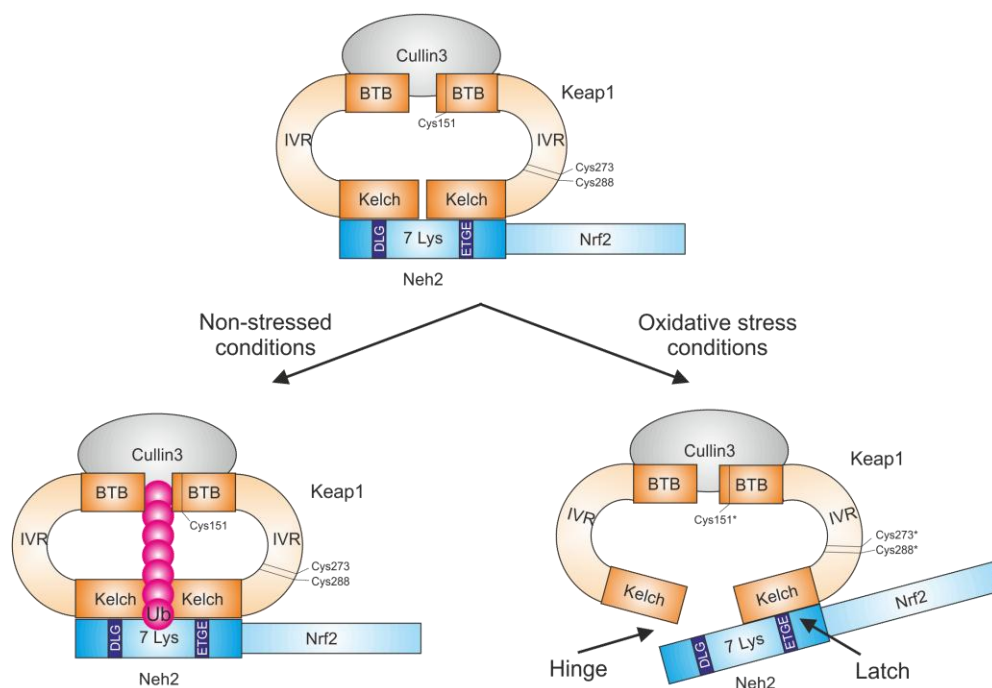


B. Oxidative stress conditions.



**Figure 3. Model of Nrf2 canonical regulation by Keap1.** **A**, In non-stressed conditions, Nrf2 is ubiquitinated through the Keap1-Cullin3 ubiquitin ligase complex. As a consequence, the constitutive levels of Nrf2 are very low. **B**, Upon exposure to electrophile or oxidative stress, Keap1 is modified at its regulatory cysteine residues and inactivated (see Figure 4 for more details). Keap1 inactivation enhances Nrf2 nuclear accumulation, leading to transcriptional activation of ARE-driven phase II genes (98, 109, 234).

degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma (Fig. 3A). Recientemente, se ha caracterizado el modelo de unión entre Nrf2 y Keap1. Este modelo, denominado de dos anclajes (144) o de bisagra y cierre (209), explica la interacción entre Nrf2 y Keap1 en condiciones normales y oxidantes (144, 208-209). En condiciones normales, dos moléculas de Keap1 se unen a una molécula de Nrf2 a través de los residuos ETGE (bisagra) y DLG (cierre) del dominio Neh2 de Nrf2 (Fig. 4). Los dominios ETGE y DLG presentan afinidades distintas por Nrf2, siendo el dominio ETGE 100 veces más afin. Ambas regiones están conectadas mediante una hélice  $\alpha$ , que contiene siete residuos de lisina, las cuales son dianas para la ubiquitinación y degradación de Nrf2. En condiciones oxidantes, las especies reactivas de oxígeno, los compuestos electrofílicos o los agentes xenobióticos provocan la formación de aductos u oxidación de grupos sulfhidrilo de algunos de los 25 residuos de cisteína presentes en Keap1. Algunas de estas cisteínas actúan como sensores del estado redox celular, siendo las Cys151, 273 y 288 las más sensibles a la interacción con compuestos electrofílicos (212-213, 227, 234). Estas



**Figure 4.** The interaction between Nrf2 and Keap1 occurs via a “two-site tethering” process, otherwise called the “hinge and latch” mechanism. In this model, two motifs, a high-affinity ETGE motif and a low-affinity DLG motif, within the N-terminal Neh2 domain of Nrf2 each interact with a separate Kelch repeat domain present in the Keap1 homodimer. Both the ETGE motif and the DLG motif are required for Keap1 mediated repression. In addition to its interaction with Nrf2, Keap1 also binds Cullin 3 (Cul3), which forms a core E3 ubiquitin ligase complex through an association with Ring-box1 protein (Rbx1, also called Roc1). The Keap1-Cul3-Rbx1 complex is able to ubiquitinate Nrf2 and target it for proteasomal degradation only under normal redox conditions, and upon exposure to oxidants or electrophiles, Cys-151, Cys-273, and Cys-288 in Keap1 become modified, leading to disturbance of the interaction between Nrf2 and Keap1. Failure of Nrf2 to dock simultaneously onto both Kelch repeat domains enables it to escape ubiquitination by Cul3-Rbx1.

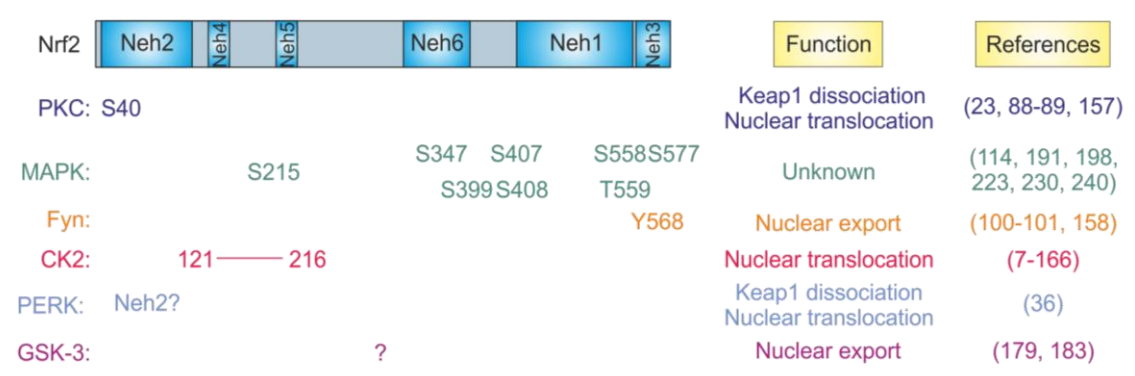
INTRODUCCIÓN

modificaciones suponen un cambio en la estructura del dímero de Keap1 de forma que su asociación con el motivo DLG de Nrf2 se rompe (Fig. 4). No ocurre así con la interacción entre Keap1 y el dominio ETGE de Nrf2 que se mantiene. Sin embargo, el cambio conformacional de esta estructura tiene como consecuencia que Nrf2 no adopta la conformación correcta para ser ubiquitinado y por lo tanto, aunque permanece unido, no puede ser degradado y provoca el secuestro de Keap1. Este mecanismo permite a la proteína Nrf2 de nueva síntesis escapar a la interacción con Keap1, de manera que se estabiliza y se transloca al núcleo (Fig. 3B). Es en este compartimento donde Nrf2 heterodimeriza con las proteínas *small Maf* y se une a los ARE de los promotores de los genes de fase II.

1.2.2 La regulación de Nrf2 a través de vías de señalización.

Nrf2 es una proteína de carácter ácido (punto isoeléctrico, pI 4.46) con 46 residuos de Asp y 57 de Glu. Además, un 17% de los residuos de Nrf2 son Ser (66), Thr (26) o Tyr (10). Estos sitios podrían ser dianas de fosforilación para varias quinasas, incrementando aún más su naturaleza ácida. Nrf2 posee una masa molecular teórica de 67 kDa pero exhibe un patrón anómalo en SDS-PAGE, migrando con una masa molecular aparente de 96-100 kDa (148). Esto es debido, en parte, a su naturaleza ácida y a su fosforilación. La presencia de varios sitios putativos de fosforilación en Nrf2 dificulta la identificación de fosforilaciones relevantes que afecten su actividad transcripcional. A continuación se describen varias quinasas implicadas en el control de Nrf2 (Fig. 5).

**Proteína quinasa C (PKC).** Las primeras evidencias que relacionan la activación de PKC con la expresión de genes de fase II fueron obtenidas mediante el uso de ésteres de forbol (2, 59, 154). Estos compuestos promotores de tumores, que activan PKC, indujeron



**Figure 5. Protein kinase regulation of Nrf2.** The figure shows only those residues or regions that have been reported to be phosphorylated *in vivo* and whose mutations have been analyzed. The putative effect of phosphorylation on Nrf2 activity also is indicated. For Zipper and Mulcahy's study, which was conducted with human Nrf2, the residue numbers have been corrected for the mouse sequence.



la expresión de los genes GSTA1 y GSTA2 *in vivo*. Más adelante, el grupo del Dr. Pickett demostró que Nrf2 es fosforilado por PKC conduciendo a la activación de los genes de fase II, sugiriendo que la fosforilación directa de Nrf2 conduce a su translocación nuclear para potenciar la respuesta frente a daño oxidativo (89). De manera independiente dos grupos identificaron a la Ser<sup>40</sup> de Nrf2 como el residuo fosforilado por PKC (23, 88). Esta fosforilación promueve un cambio conformacional que conduce a la disociación de Keap1 y Nrf2. Un estudio posterior del grupo del Dr. Jaiswal (157) sugiere que no sólo es necesaria la fosforilación de la Ser<sup>40</sup> por PKC sino que la modificación de la Cys<sup>151</sup> de Keap1 también es requerida para su liberación de Keap1, por lo que la contribución de esta fosforilación en la regulación de Nrf2 es limitada.

**Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas).** Numerosos estudios demuestran que los compuestos xenobióticos activan las vías de señalización de MAP quinasas representadas por la quinasa del extremo NH<sub>2</sub> de c-Jun (JNK), la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) y la quinasa p38 (200). Estas quinasas catalizan la fosforilación de Ser o Thr adyacentes a un residuo de Pro. Nrf2 contiene 6 residuos de SP altamente conservados que son posibles sitios de fosforilación por estas quinasas (Fig. 5). Varios grupos han modificado la actividad de las MAP quinasas mediante estrategias farmacológicas y genéticas para determinar su importancia en la actividad transcripcional de Nrf2 (114, 192, 225, 232). Sin embargo, los resultados obtenidos no están claros o incluso son contradictorios (192, 242). Recientemente, el grupo de la Dra. Zhang ha descrito la fosforilación de Nrf2 por MAP quinasas *in vivo* por espectrometría de masas (200). Identificaron 5 sitios de fosforilación (Ser<sup>215</sup>, Ser<sup>408</sup>, Ser<sup>558</sup>, Thr<sup>559</sup> y Ser<sup>577</sup>) de los cuales 3 son dirigidos a prolina. Sin embargo, la mutación puntual de estos residuos no tuvo un efecto concluyente en la función de Nrf2. Únicamente se observó un leve incremento en los niveles nucleares. En conjunto, estos resultados indican que la fosforilación directa de Nrf2 por MAP quinasas tiene una contribución limitada en la modulación de Nrf2.

**La vía de PI3K/Akt/GSK-3.** La vía de supervivencia, representada por la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y la Ser/Thr proteína quinasa Akt, activa la expresión de las enzimas de detoxificación y protege frente a agentes oxidativos (185), sugiriendo la participación de Nrf2 en la mediación de esta respuesta. Varios estudios revelan que la ruta de PI3K participa en la translocación de Nrf2 desde el citosol al núcleo (110, 128). Considerando la posibilidad de que una proteína quinasa por debajo de PI3K fuese la responsable de la modulación de Nrf2, el grupo del Dr. Cuadrado (140) demostró que el carnosol, un diterpeno fenólico derivado del romero, utiliza a Akt para inducir la expresión

## INTRODUCCIÓN

de HO-1 dependiente de Nrf2 en células de feocromocitoma PC12. Akt cataliza la fosforilación de Ser/Thr en la secuencia consenso RxxS/TxS. Esta secuencia no se encuentra en Nrf2, sugiriendo la existencia de un nexo indirecto de unión entre Akt y Nrf2. Entre las proteínas reguladas por Akt se encuentra la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), que se describirá en profundidad más adelante. La primera evidencia de que GSK-3 inhibe Nrf2 fue descrita en *C. elegans* (4). En ausencia de estrés oxidativo, la fosforilación de SKN-1, el ortólogo de Nrf1/2 en *C. elegans*, impide su acumulación en el núcleo evitando su funcionamiento constitutivo en las células epiteliales de su intestino. Los autores identificaron un grupo de 4 serinas fosforiladas por GSK-3 conservadas en Nrf1 de mamífero. También señalaron un sitio putativo de fosforilación por GSK-3 en Nrf2 de mamífero pero estudios de mutagénesis realizados en el grupo del Dr. Cuadrado demostraron que esta secuencia no está realmente regulada por GSK-3 (observaciones no publicadas). Posteriormente, se estudió en mamíferos que GSK-3 promueve la exclusión nuclear de Nrf2 (180, 184). Sin embargo, el mecanismo molecular a través del cual GSK-3 modula la actividad de Nrf2 se desconoce. A lo largo de esta Tesis se han utilizado diferentes abordajes para analizar el mecanismo de regulación de Nrf2 por GSK-3.

**Familia Src de proteína tirosina quinasas.** El grupo del Dr. Jaiswal ha descrito la fosforilación de la Tyr<sup>568</sup> de Nrf2. Dicha fosforilación promueve el transporte nuclear de Nrf2 dependiente de la exportina Crm1 y su posterior degradación (101). La relación con el estrés oxidativo se estableció mediante experimentos adicionales que revelaron que el eje GSK-3/Tyr quinasa Fyn participa en la regulación de Nrf2. El peróxido de hidrógeno provoca la fosforilación de la Tyr<sup>216</sup> de GSK-3 $\beta$  promoviendo su activación. GSK-3 $\beta$  fosforila entonces a Fyn en residuos de Thr. Fyn fosforilado se acumula en el núcleo y fosforila a Nrf2 en la Tyr<sup>568</sup> promoviendo su transporte y degradación. Posteriormente, este grupo ha descrito un mecanismo alternativo de regulación de Nrf2 por GSK-3 $\beta$  que implica la translocación nuclear de otras quinasas de esta familia como Src, Yes y Fgr (100, 158).

**Caseína quinasa CK2.** De acuerdo con el trabajo de Pi (167), la Ser/Thr quinasa CK2 promueve la degradación de Nrf2 a través de su fosforilación. La secuencia humana de Nrf2 posee 13 sitios candidatos de fosforilación por CK2, 11 de ellos conservados entre diferentes especies. Sin embargo, la mutación puntual de estos 13 sitios no alteró la movilidad electroforética de Nrf2, sugiriendo la existencia de otros sitios adicionales. En otro estudio, la delección desde ambos extremos C y N terminales de Nrf2 indicaron que la región fosforilada por CK2 se encuentra entre los dominios Neh4 y Neh5 de Nrf2 (7). Aunque ambos estudios indican que CK2 fosforila a Nrf2, las consecuencias de esta



modificación son distintas ya que el primero analiza la inducción de CK2 por estrés y el segundo en condiciones basales.

**Respuesta frente a estrés de retículo endoplásmico (RE).** La respuesta frente a proteínas mal plegadas (*Unfolded protein response*, UPR) es un mecanismo de defensa activado por acumulación de estas proteínas en el RE. La proteína quinasa PERK participa en la fase temprana de la UPR fosforilando eIF2a, bloqueando así la traducción de proteínas. El grupo del Dr. Diehl (36) identificó a Nrf2 como otro sustrato de PERK. La UPR da lugar al importe nuclear de Nrf2 permaneciendo Keap1 en el citosol. Aún no se conocen los residuos que son fosforilados por PERK, pero puesto que el complejo Nrf2/Keap1 se disocia, podría ocurrir sobre el dominio Neh2 de Nrf2.

### 1.3 *Nrf2 como diana farmacológica de patologías relacionadas con estrés oxidativo.*

#### 1.3.1 **Inductores de Nrf2.**

Teniendo en cuenta el papel clave de Nrf2 en el control de la homeostasis redox celular, Nrf2 podría ser una novedosa diana farmacológica para aportar un beneficio terapéutico frente a enfermedades relacionadas con estrés oxidativo, como cáncer, diabetes, epilepsia o enfermedades neurodegenerativas. La vía clásica de Keap1/Nrf2 se activa por la presencia de compuestos endógenos como 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 (PG-J2), ácido nitro-oleico, óxido nítrico, peróxido de hidrógeno o sulfuro de hidrógeno, pero también se puede activar mediante el tratamiento con agentes exógenos procedentes de la dieta o de origen sintético. En función de su estructura química de estos compuestos se han clasificado en diez grupos (Fig. 6) (8, 49, 84). La mayoría de los compuestos inductores de Nrf2 más utilizados tanto en modelos animales como *in vitro* se encuentran entre los cuatro primeros grupos. A lo largo de esta Tesis se utilizarán tres inductores de Nrf2: tert-butilhidroquinona (tBHQ), sulforafano (SFN) y ácido nordihidroguayarático (NDGA).

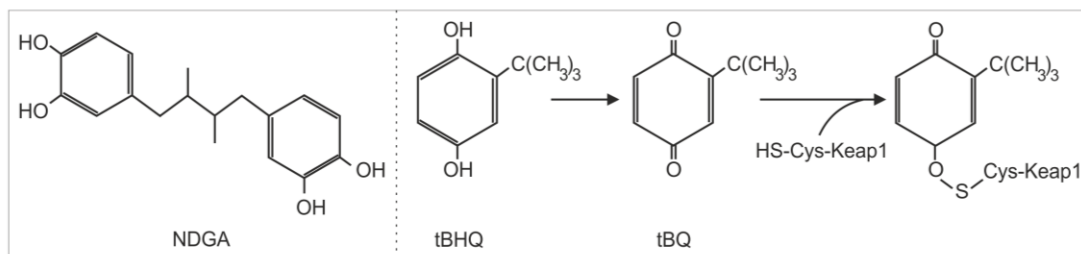
- **Ácido nordihidroguayarático (NDGA).**

El ácido nordihidroguayarático (NDGA, 4-[4-(3,4-dihidroxifenil)-2,3-dimethylbutil]benzeno-1,2-diol)) es un potente antioxidante que está presente en altas concentraciones en las hojas de la creosota o chaparral (*Larrea tridentata*) (Fig. 6.1). El NDGA pertenece al grupo de compuestos difenólicos de naturaleza bifuncional, ya que es una molécula antioxidante que puede secuestrar anión peroxinitrito, oxígeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso (6, 62, 226), pero también actúa activando la expresión de

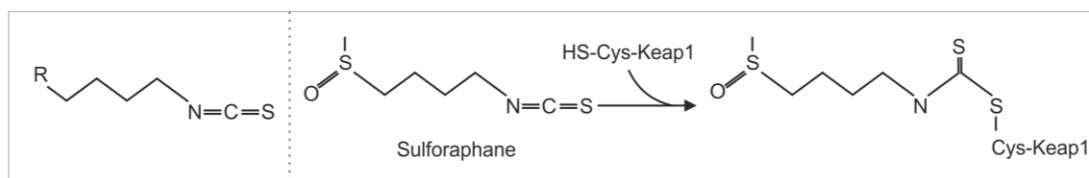
## INTRODUCCIÓN

genes antioxidantes. Recientemente, el grupo del Dr. Cuadrado ha descrito que el NDGA protege frente a estrés oxidativo a neuronas granulares de cerebelo mediante la activación de Nrf2 y la inducción de genes citoprotectores, como HO-1 (71). El mecanismo a través del cual el NDGA provoca la inducción de Nrf2 será objeto de estudio en esta Tesis.

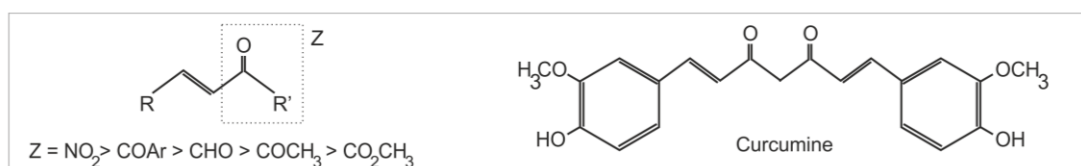
### 1. Oxidizable diphenols oxidizables, phenylenediamines and quinones.



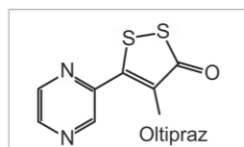
### 2. Isothiocyanates.



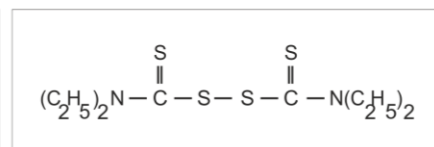
### 3. Michael reaction acceptors.



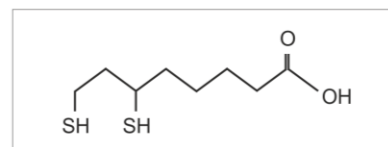
### 4. Dithiolthiones



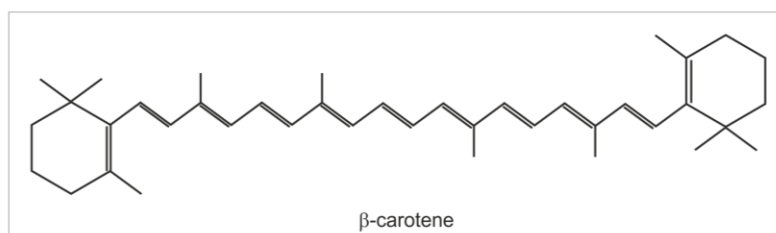
### 5. Thiocarbamates.



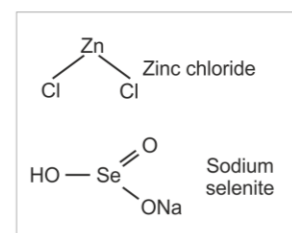
### 6. Vicinal dimercaptans.



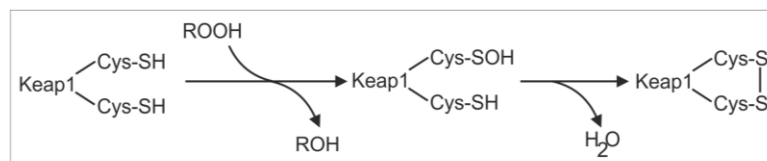
### 7. Polyenes



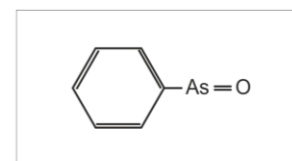
### 8. Heavy metals.



### 9. Hydroperoxides.



### 10. Trivalent arsenicals.



**Figure 6. Classification of phase II gene inducers.** At least 10 chemical classes of classical gene inducers have been identified (84). Note the molecular structure of NDGA in group 1 with two catechol rings that can be oxidized to catechol quinones.

- **Tert-butilhidroquinona (tBHQ).**

A finales de la década de 1970, Talalay y colaboradores describieron que la administración en la dieta del compuesto fenólico BHA (2(3)-tert-butil-4-hidroxianisol) en ratones reducía la formación de metabolitos mutagénicos de benzopirenos e inducía las enzimas GST y NQO1 en diversos tejidos (14-16). Estudios realizados con la versión demetilada de BHA, la tert-butilhidroquinona (tBHQ) demuestran que la presencia del radical fenol libre hace que sea más potente que el BHA en la inducción de estos genes (43, 175-176). La tBHQ es comúnmente utilizada como inductor de Nrf2 *in vitro* e *in vivo* (105-106, 115). Recientemente, se ha descrito que la tBHQ ejerce un efecto neuroprotector frente a daño oxidativo y apoptosis inducida por el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) en neuronas en cultivo (53) y en ratas inyectadas con  $A\beta$  (160), y además reduce la acumulación del péptido  $A\beta$  que constituye las placas seniles en la enfermedad de Alzheimer. Este tipo de compuestos inducen la activación de Nrf2 a través de un mecanismo bifásico que consiste en la oxidación de los grupos difenoles a sus correspondientes derivados quinona, seguido de la modificación de las cisteínas reactivas de Keap1 (13) (Fig. 6.1).

- **Sulforafano (SFN).**

Los isotiocianatos se producen de manera natural a partir de precursores glucosinatos que son abundantes en vegetales crucíferos como, por ejemplo, de la familia *Brassicaceae*, que incluye la *Brassica oleracea* (brócoli, repollo, coliflor y coles de Bruselas) y la *B. rapa* (col china y nabo) (58, 72). Químicamente, los isotiocianatos se caracterizan por un el grupo  $-N=C=S$ , cuyo átomo de carbono central es altamente electrofílico y reacciona con los grupos sulfhidrilo generando un ditiocarbamato (Fig. 6.2). El isotiocianato mejor caracterizado es el sulforafano [1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)butano]. Fue aislado a partir de las yemas de brócoli de tres días y se trata de uno de los activadores más potentes de Nrf2 que se conocen (236). El sulforafano reacciona con los grupos tiol de las cisteínas reactivas de Keap1 para formar aductos tionoacil (50), promoviendo la inactivación de Keap1 y por tanto permitiendo la estabilización de Nrf2. El sulforafano se ha utilizado en diferentes modelos *in vivo* para inducir la respuesta antioxidante mediada por Nrf2, como por ejemplo isquemia-reperfusión (238), hipoxia (169), inflamación por LPS (93) y neurodegeneración producida por las toxinas parkinsonianas 6-OHDA y MPTP (24, 62).

El estudio de los mecanismos de acción de estos agentes xenobióticos se ha centrado fundamentalmente en la modulación de la asociación de Keap1 y Nrf2. Sin embargo, como ya se ha comentado, Nrf2 es fosforilado en respuesta a diversas cascadas

## INTRODUCCIÓN

de señalización, como PI3K/Akt o las MAP quinasas, lo cual sugiere mecanismo adicionales de regulación. Recientemente, se ha descrito que algunos agentes xenobióticos también promueven la activación de Nrf2 a través de estas rutas. Por ejemplo, el carnosol, la tBHQ, los triterpenoides y las estatinas promueven la activación de la vía de PI3K/Akt (9, 40, 128, 140, 171) y la curcumina, el ácido  $\alpha$ -lipoico o la quercetina causan la activación de las MAP quinasas p38, JNK o ERK (9, 131, 171).

La regulación farmacológica de las quinasas que componen estas vías supone un abordaje terapéutico alternativo a los inductores clásicos. A lo largo de esta Tesis, utilizaremos el NDGA como agente modelo de activación de Nrf2 dependiente de Keap1 y de vías de señalización de quinasas, y nos centraremos en la quinasa GSK-3 como diana farmacológica para la modulación de Nrf2.

### 1.3.2 Regulación farmacológica de Nrf2 en un modelo de excitotoxicidad inducida por kainato.

El estrés oxidativo es un elemento clave en la etiopatología de muchas enfermedades neurológicas como la epilepsia lóbulo temporal y enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer. La excitotoxicidad mediada por los receptores de glutamato, NMDA y AMPA, puede estar implicada en la patología de estas enfermedades neurológicas, dado que una de sus características principales es la generación masiva de ROS que conduce a muerte celular por apoptosis y necrosis (52, 177, 189). Así, la sobreexcitación de estos receptores por un exceso de glutamato o por excitotoxinas como NMDA o kainato provoca la entrada de iones de calcio en la célula. Una de las consecuencias de esta entrada masiva de calcio es la despolarización de la mitocondria y la liberación de ROS.

El kainato (KA) es un análogo del glutamato y por tanto mimetiza su efecto sobre los receptores de glutamato, NMDA y AMPA, aumentando los niveles de calcio intracelular y los niveles de ROS (61, 66-67, 135, 155). El kainato cruza la barrera hematoencefálica y promueve alteraciones del hipocampo que se parecen a las que ocurren en la epilepsia lóbulo temporal, incluyendo la pérdida neuronal en la región CA3 del hipocampo (12). Estudios recientes (25, 69, 118) sugieren que GSK-3 está implicada en la señalización intracelular asociada a la excitotoxicidad inducida por kainato; sin embargo, aún se desconoce cómo GSK-3 actúa controlando este mecanismo. Ya que en esta Tesis describiremos que Nrf2 es regulado por GSK-3, hemos estudiado el posible valor de esta regulación en un modelo de excitotoxicidad inducida por kainato.

## 2 Glucógeno sintasa quinasa 3.

La glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) (EC 2.7.11.26) es una Ser/Thr proteína quinasa que fue descrita en 1980 (56) como la quinasa reguladora de la glucógeno sintasa (GS), enzima clave en la síntesis del glucógeno. Sin embargo, a pesar de su nombre, esta enzima está implicada en muchos otros procesos celulares tales como la señalización de insulina, proliferación celular, función neuronal, oncogénesis o desarrollo embrionario. Dadas sus múltiples funciones, esta quinasa ha sido relacionada con diferentes patologías como diabetes, cáncer, trastorno bipolar o enfermedad de Alzheimer.

A diferencia de otras quinasas, GSK-3 está activa en condiciones basales y se inactiva en respuesta a diferentes señales celulares (51, 77). GSK-3 fosforila a sus sustratos dentro de un motivo consenso cuya secuencia es Ser/Thr(X)<sub>1-4</sub>pSer/pThr, siendo X cualquier aminoácido y pSer/pThr un residuo previamente fosforilado por otras quinasas (residuo primado). Sin embargo, no en todos los casos es necesario este requisito, ya que GSK-3 también puede fosforilar sin necesidad de primado en residuos de Ser o Thr dirigidos a Pro (201).

### 2.1 GSK-3 $\alpha$ y GSK-3 $\beta$ .

GSK-3 posee dos isoformas codificadas por dos genes diferentes, *GSK3A* y *GSK3B* que codifican GSK-3 $\alpha$  y GSK-3 $\beta$ , respectivamente. GSK-3 $\alpha$  tiene un peso molecular mayor que GSK-3 $\beta$  debido a que contiene una extensión en su dominio N-terminal (220-221). Estas dos isoformas comparten un 85% de homología, siendo prácticamente homólogas en el dominio quinasa (97%). Sin embargo, en ciertos casos la función de ambas isoformas no es redundante. Por ejemplo, la delección de GSK-3 $\beta$  provoca letalidad embrionaria en el día E16 (83). Aunque ambas isoformas son ubicuas en todos los tejidos, GSK-3 $\beta$  es particularmente abundante en cerebro. Una variante alternativa de GSK-3 $\beta$  llamada GSK-3 $\beta$ 2, que contiene un inserto de 13 aminoácidos dentro del dominio quinasa, ha sido identificada recientemente (149). Esta isoforma sólo se expresa en neuronas diferenciadas, no en células gliales (219), sugiriendo un papel en la iniciación de la diferenciación neuronal y en el mantenimiento de las neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso.

### 2.2 Regulación de GSK-3.

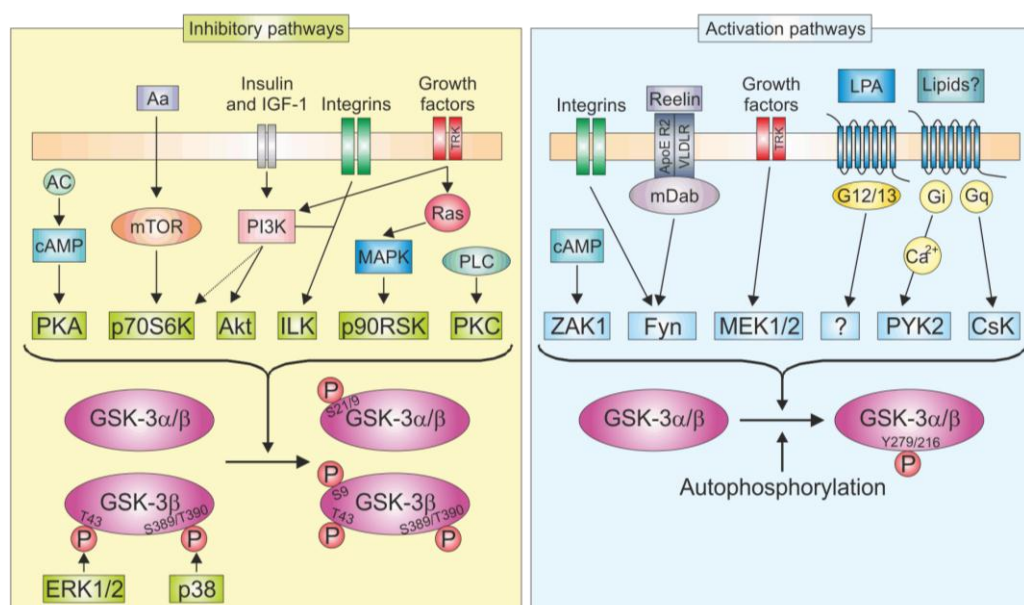
Se han descrito más de 40 proteínas como sustratos de GSK-3. Entre ellas al menos una docena son factores de transcripción. Este alto número indica el gran potencial

## INTRODUCCIÓN

de GSK-3 para controlar varias funciones celulares. Esto sugiere que la actividad de esta quinasa debe estar cuidadosamente regulada.

GSK-3 está regulada por fosforilación de una serina N-terminal en el dominio pseudosustrato, Ser21 en GSK-3 $\alpha$  y Ser9 en GSK-3 $\beta$ . Varias quinasas pueden fosforilar estas serinas, incluyendo a Akt, proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC) y p90Rsk (Fig. 7). Diversos estímulos, como la insulina o el choque térmico o el estrés oxidativo, pueden conducir a la activación de la vía de PI3K/Akt promoviendo la inhibición de GSK-3 (21, 34, 55, 205). Además de este residuo de Ser, otros dos sitios de inactivación de GSK-3 $\beta$  han sido descritos recientemente. Uno de ellos es la Thr43, que es fosforilada por ERK1/2 (48), y el otro es la Ser289 de ratón o Thr390 humana de GSK-3 $\beta$ , que es fosforilada por p38 MAPK (207). La fosforilación de estas serinas inhibe a GSK-3 $\beta$  de manera directa y de manera indirecta al aumentar la capacidad de la Ser9 para ser fosforilada por otras quinasas.

Por otra parte, la fosforilación de la Tyr 279 de GSK-3 $\alpha$  o 216 de GSK-3 $\beta$  de su segmento de activación (*T-loop*) incrementa su actividad quinasa (187). Diversos estudios



**Figure 7. Regulation of GSK-3 by phosphorylation. Inhibitory pathways,** Many kinases are capable of phosphorylating GSK-3 at Ser21/Ser9 promoting its inactivation, such as Akt, ILK, PKA, and p90Rsk. Moreover, many physiological situations of inhibition of GSK-3 correlate with serine phosphorylation, such as Insulin/IGF1, integrins or growth factors. Additionally, two other regulatory sites have been described. One is the threonine 43, present only in the isoform GSK-3 $\beta$ , which may be phosphorylated by ERK1/2. This phosphorylation correlated with GSK-3 inhibition. Second, serine 389 and threonine 390 present in GSK-3 $\beta$  have been shown to be phosphorylated by p38 MAPK. In both cases, the data suggested that this phosphorylation may increase the capacity of Ser-9 to be phosphorylated rather than promote a direct inhibition. **Activation pathways,** Different candidates such as Pyk-2 and Fyn kinases have been reported to be able to phosphorylate GSK-3 *in vitro* on Tyr279/216 of GSK-3 $\alpha/\beta$ . More recently, an alternative hypothesis has been proposed suggesting that Tyr phosphorylation corresponds to an intramolecular autophosphorylation event that may be regulated by Hsp90.

señalan varios candidatos, como Pyk-2 o Fyn, capaces de fosforilar a GSK-3 (76, 119, 129) (Fig. 7). Sin embargo, algunos trabajos recientes sugieren que dicha Tyr se modifica por un mecanismo de autofosforilación dependiente de Hsp90 de manera constitutiva durante o inmediatamente después de su síntesis ribosomal, como parte de su maduración postraducional, alcanzando así su estado catalíticamente activo (31, 136). Por tanto, la regulación a nivel de la Y279/216 estaría mediada principalmente por fosfoTyr fosfatasas que mantendrían al enzima en estado inactivo.

La isoforma GSK-3 $\beta$  también es regulada a través de su localización celular. GSK-3 $\beta$  es preferentemente citosólica, sin embargo, también se encuentra en el núcleo, donde está más activada en comparación con la versión citosólica (19). Los niveles nucleares de GSK-3 $\beta$  varían en función de las señales intracelulares, como por ejemplo, durante el ciclo celular. Durante la fase S, GSK-3 $\beta$  aumenta en el núcleo, facilitando así la fosforilación de ciclina D1 (46). También, en procesos de apoptosis inducida por privación de suero, choque térmico y estaurosporina, los niveles nucleares de GSK-3 $\beta$  se incrementan (20). Esta acumulación es independiente de la fosforilación de GSK-3 $\beta$  en la Ser9 o en la Tyr216 y precede a la activación de caspasas. Recientemente, se ha descrito un mecanismo adicional que implica que tras la activación de la vía canónica de Wnt, GSK-3 $\beta$  es secuestrado dentro de cuerpos multivesiculares, de manera que la enzima se encuentra separada de la mayoría de sus sustratos (204).

GSK-3 $\beta$  también interacciona con diferentes proteínas *scaffold* o estructurales. El modelo más conocido es el de la vía canónica de Wnt. En este caso, GSK-3 $\beta$  se asocia con axina y APC (*adenomatous polyposis coli*), fosforilando ambas proteínas y estabilizando el complejo. Este sistema es capaz de unirse a  $\beta$ -catenina, promoviendo su fosforilación por GSK-3 $\beta$  y facilitando su degradación por la vía del proteasoma (198, 231). En esta Tesis utilizaremos la regulación de  $\beta$ -catenina por GSK-3 como control de su actividad.

### 2.3 Funciones celulares controladas por GSK-3.

Los sustratos de GSK-3 se pueden dividir en tres grupos, dependiendo de la función que desempeñen (Tabla 1).

GSK-3 regula diferentes enzimas relacionadas con procesos metabólicos y de señalización. La mejor conocida es glucógeno sintasa (GS), enzima limitante en la síntesis de glucógeno. Otras enzimas metabólicas reguladas por GSK-3 son la piruvato deshidrogenasa, la acetilCoA carboxilasa o la ATP-citrato liasa.



Metabolic and signaling proteins	Structural proteins	Transcription factors
AcetylCoA carboxylase	DF3/MUC1	AP-1 (Jun family)
APC	Dynamin-like protein	$\beta$ -catenin
APP	Kinesin light chain	C/EBP
ATP-citrate lyase	MAP1B	CREB
Axin	MAP2	GATA4
Cyclic AMP-dependent	NCAM	Glucocorticoid receptor
protein kinase	Neurofilaments	HIF-1
Cyclin D1	Ninein	HSF-1
Cyclin E	Tau	Mash-1
eIF2B	Telokin (KRP)	MITF
Glycogen synthase		c-Myb
IRS-1		c-Myc
LRP5/6		NeuroD
Myelin basic protein		NFAT
NGF receptor		NF $\kappa$ B (p65 y p105)
Nucleoporin p62		Notch
p21		p53
Presenillin-1		Snail
Protein phosphatase inhibitor-2		TCF
Protein phosphatase 1		
Protein kinase A (subunit RII)		
Pyruvate dehydrogenase		

**Table 1. Mammalian proteins phosphorylated by GSK-3.** Abbreviations: AP-1, activator protein-1; APC, adenomatous polyposis coli gene product; C/EBP, CCAAT/enhancer-binding protein; CREB, cyclic AMP response element binding protein; DF3/MUC1, high molecular weight mucin-like glycoprotein; eIF2B, Eukaryotic initiation factor 2B; HIF-1, hypoxia-inducible factor-1; HSF-1, heat shock factor-1; KRP, kinase-related protein; MAP, microtubule-associated protein; Mash1, mammalian achaete-scute homolog 1; MITF, microphthalmia-associated transcription factor; NFAT, nuclear factor of activated T cells; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; NGF, nerve growth factor; TCF, T cell factor.

Entre los sustratos de GSK-3 también se encuentran proteínas de tipo estructural como las proteínas del citoesqueleto asociadas a microtúbulos, MAP (*microtubule associated protein*), entre ellas, Tau y subtipos de MAP1 y MAP2. La estabilidad de los microtúbulos depende de las MAP, cuya función está regulada por mecanismos de fosforilación-defosforilación. Tau es el componente principal de los ovillos neurofibrilares, característicos de la enfermedad de Alzheimer. *In vivo*, Tau fue identificado como sustrato de GSK-3 en 1992 (75). GSK-3, en cooperación con otras quinasas, fosforila a Tau en al menos 10 sitios diferentes. Además, GSK-3 ha sido



recientemente propuesta como el enlace entre las dos características patológicas de la enfermedad de Alzheimer, las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (150).

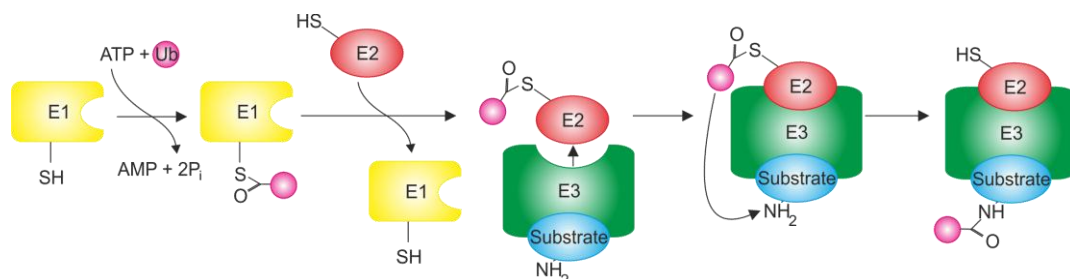
GSK-3 también controla la actividad de varios factores de transcripción, como por ejemplo,  $\beta$ -catenina, Snail, AP-1 (*activator protein-1*), NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) y HSF1 (*heat shock factor 1*), en la mayoría de los casos, promoviendo su inhibición.

### 3 La degradación de Nrf2 por el sistema ubiquitina-proteasoma como mecanismo de regulación.

El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) controla las vías celulares implicadas en procesos de homeostasis celular, incluidas proliferación y supervivencia (168). Varios estudios sugieren que la activación constitutiva de Nrf2 como consecuencia de mutaciones en Keap1 o en Nrf2 promueve una respuesta antioxidante alterada, aumentando la proliferación celular y haciendo a las células quimiorresistentes (120, 162, 194). Estos resultados evidencian la necesidad de controlar de los niveles de Nrf2 para mantener la homeostasis redox celular.

#### 3.1 Funcionamiento del sistema ubiquitina-proteasoma.

La ubiquitina es una proteína reguladora que se encuentra en la mayoría de los tejidos de los organismos eucariotas. La unión covalente de la ubiquitina con una lisina del sustrato media su reconocimiento y su degradación por el proteasoma. La reacción de ubiquitinación requiere la coordinación de tres clases diferentes de enzimas: E1, E2 y E3 (Fig. 8). La enzima activadora de ubiquitina, E1, y la enzima conjugadora de ubiquitina, E2, están involucradas en activar y transferir la ubiquitina a través de la formación de un enlace tioéster. Las enzimas E3 ubiquitina ligasa son complejos multiproteicos que



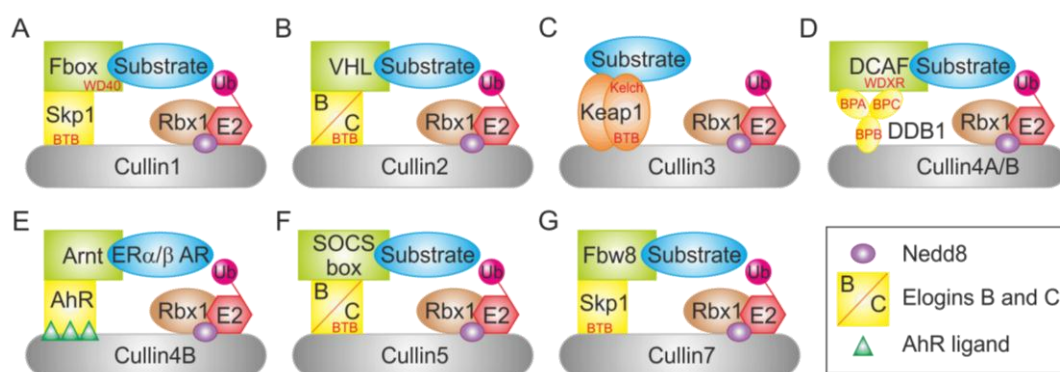
**Figure 8. The ubiquitin-proteasome system.** Ubiquitin modification is an ATP-dependent process carried out by three classes of enzymes. The ubiquitin activating enzyme (E1) forms a thio-ester bond with ubiquitin, a highly conserved 76 amino acid protein. This reaction allows subsequent binding of ubiquitin to a ubiquitin conjugating enzyme (E2), followed by the formation of an isopeptide bond between the carboxy-terminus of ubiquitin and a lysine residue on the substrate protein. The latter reaction requires a “ubiquitin ligase” (E3). E3 enzymes function as the substrate recognition modules of the system and are capable of interaction with both E2 and substrate.

## INTRODUCCIÓN

reconocen específicamente sus sustratos y median la transferencia de ubiquitina entre E2 y el sustrato, marcándolo para su degradación.

### 3.2 Clasificación de los complejos de degradación.

Los complejos de degradación se han clasificado en dos grupos según el tipo de E3 ubiquitina ligasa que compone el sistema: tipo dominio HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus* (90)) y tipo RING-Finger (*Really Interesting New Gene* (107)). Las E3 ligasas HECT muestran actividad catalítica mientras que la del tipo RING promueven la ubiquitinación aproximando la enzima E2 al sustrato. Las tipo RING se dividen en dos grupos: con una subunidad o con múltiples subunidades (68). Estudios genéticos y bioquímicos, principalmente realizados en levaduras, han permitido la identificación y caracterización de dos tipos de E3 ligasas RING con múltiples subunidades: el complejo APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*) y los complejos CDL (*Cullin dependent ligase*). Estos complejos a su vez se dividen en varios subtipos en función de la proteína Cullin que los forme. Se han descrito hasta siete clases de Cullin, siendo los complejos formados por Cul3 y por Cul1 los mejor caracterizados hasta el momento y los más relevantes para esta Tesis (Fig. 9).



**Figure 9. The seven Cullin-ring ligases.** A, Cul1, B, Cul2, C, Cul3, D, Cul4A and Cul4B, E, Cul4B, F, Cul5, and G, Cul7 Cullin-ring ligases. Words listed in red are all domain names. BPA, BPB, and BPC are the three propeller domains of DDB1. Figure modified from (212).

#### 3.2.1 E3 ligasa Cul3/Keap1.

Los complejos de degradación centrados en la proteína Cullin3 unen por un lado a la proteína Rbx1 (también llamada Hrt1 o Roc1), encargada de acoplar la enzima E2, y por otro lado a proteínas de la familia BTB (*Bric-à-Brac, tramtrack, broad complex*), como Keap1, cuya función es unir al sustrato (Fig. 9C). Estas proteínas interaccionan con Cul3, pero no con otras Cullin, indicando la especificidad de este sistema de degradación. Existe un gran número de proteínas BTB, la mayoría de ellas implicadas en la regulación de la dinámica de microtúbulos y microfilamentos, transcripción y mecanismos de apoptosis.

Entre los casos más representativos está la regulación de Nrf2 por Keap1 (Fig. 9C). Keap1 se une a través de su dominio BTB a Cullin3, mientras que a través del dominio Kelch permanece unido a Nrf2. De esta forma, aproxima Nrf2 a la enzima conjugadora E2, promoviendo la transferencia de moléculas de ubiquitina hacia los residuos de lisina del dominio Neh2 de Nrf2, y marcándolo así para degradación por el proteasoma (35, 122, 234). Este complejo es sensible a agentes xenobióticos y estrés oxidativo debido a que, como se ha descrito anteriormente (Fig. 4), las cisteínas reactivas del dominio BTB de Keap1 se modifican evitando la orientación correcta de Keap1 para transferir ubiquitina a Nrf2 desde la E2 (50, 54, 85-86, 213, 233).

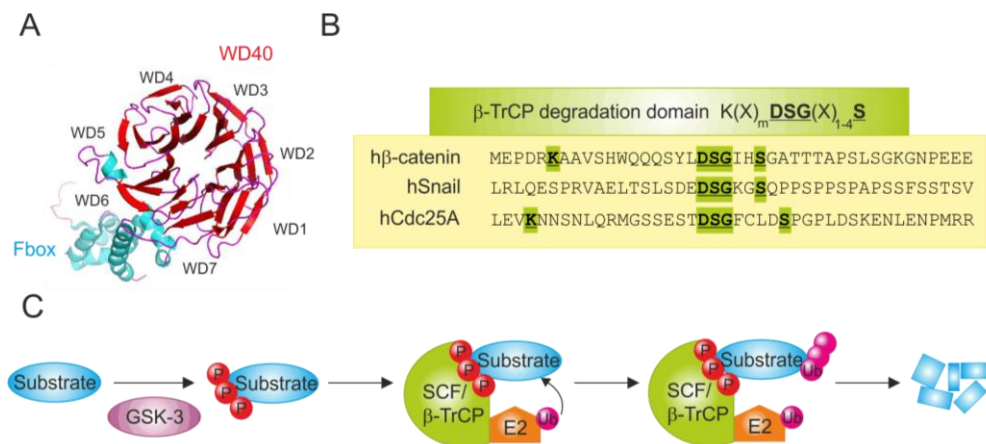
### 3.2.2 El complejo SCF/ $\beta$ -TrCP (Skp1-Cullin1-proteínas Fbox/ $\beta$ -TrCP).

Los complejos Skp1-Cullin1-proteínas Fbox o SCF marcan para degradación a multitud de sustratos en levaduras y en eucariotas superiores. La resolución de la estructura cristalizada del complejo fue un importante paso hacia el entendimiento de la composición molecular y la función de este sistema de degradación (188, 239). En este complejo, la unidad Cul1 funciona como un anclaje molecular que interacciona simultáneamente a través de su extremo N-terminal con la proteína adaptadora Skp1 (*S-phase-kinase-associated protein-1*) y a través de su extremo C-terminal con la proteína Rbx1, que a su vez, une a la enzima E2 (Fig. 9A). La proteína Skp1 funciona como enlace entre el complejo formado por Cul1 y las proteínas encargadas del reconocimiento específico de cada sustrato, llamadas proteínas Fbox. Este tipo de proteínas se caracterizan por tener una secuencia conservada de 40 aminoácidos denominada el dominio Fbox, a través del cual se unen a Skp1. La especificidad de sustrato está determinada por su dominio C-terminal, que contiene diversos motivos de interacción proteína-proteína, entre las que se pueden encontrar repeticiones ricas en leucina (LRR) y repeticiones WD (WD40) (45, 65). En función de la secuencia de estos dominios, las proteínas Fbox se clasifican en Fbw, Fbl y Fbx (28, 218).

La proteína  $\beta$ -TrCP ( *$\beta$ -Transducin repeat-Containing Protein*) pertenece a la familia Fbw (*F-box/WD40 repeat containing protein*), cuyas características principales son la presencia de un motivo Fbox de 42-48 aminoácidos en el extremo N-terminal y siete repeticiones WD40 en su extremo C-terminal que constituyen una hélice beta (Fig. 10A). Dentro de esta familia se encuentran las versiones de mamífero  $\beta$ -TrCP1 (también llamado FWD1 o Fbw1a (137, 229)) y  $\beta$ -TrCP2 (denominado HOS o Fbw1b (17, 64, 202)).  $\beta$ -TrCP está muy conservado desde *Xenopus* hasta humano, especialmente dentro de los motivos Fbox y WD40. Además, la organización de los genes es similar para las versiones en

## INTRODUCCIÓN

Xenopus (10) y humanas de  $\beta$ -TrCP1 (localizada en el cromosoma 10q24 (42)) y  $\beta$ -TrCP2 (localizada en el cromosoma 5q35 (124)). Las diferencias entre las estructuras primarias de las proteínas  $\beta$ -TrCP1 y  $\beta$ -TrCP2 son más notables en sus extremos N-terminales, próximos al motivo F-box. A pesar de estas diferencias, gracias a estudios con RNA de interferencia y con ratones deficientes en  $\beta$ -TrCP1, se ha demostrado que ambas isoformas tienen un papel redundante en la ubiquitinación y degradación de algunos sustratos como Emi, I $\kappa$ B y  $\beta$ -catenina (70, 153).



**Figure 10. Degradation by the SCF/ $\beta$ -TrCP complex.** **A**, Ribbon diagram of the E3 ligase adaptor  $\beta$ -TrCP (modified from protein data bank ID 1P22) showing the substrate binding domain, WD40 propeller, in red and the Skp1 binding domain, Fbox, in blue. **B**, Most of  $\beta$ -TrCP canonical substrates contain a  $K_mDSGX_{(1-4)}S$  motif in which both serines need to be phosphorylated sequentially before binding to  $\beta$ -TrCP. This motif might contain a hydrophobic amino acid between both phosphoserines. **C**, GSK-3-mediated phosphorylation of  $\beta$ -TrCP substrates allows them to be recognized by this E3 ubiquitin ligase and targeted for ubiquitination and subsequent degradation by the 26S proteasome.

El reconocimiento de los sustratos por la E3 ligasa  $\beta$ -TrCP requiere la presencia de un motivo de degradación que sigue el patrón  $K_mDSGX_{(1-4)}S$ , donde la serinas han de estar fosforiladas (Fig. 10B y C). Además, la mayoría de estos sustratos presentan un residuo de lisina para la conjugación de ubiquitina situada normalmente entre 9 y 13 aminoácidos separados hacia N-terminal. La proteína del virus VIH-1, Vpu fue la primera en la que se describió la existencia de este dominio y su interacción con  $\beta$ -TrCP humano (137). Los primeros estudios de mutagénesis del dominio  $DSGX_{(1-4)}S$  se realizaron sobre I $\kappa$ B y revelaron que la interacción con  $\beta$ -TrCP requería la fosforilación de ambas serinas (3, 228) y que la secuencia DSG era necesaria para alcanzar la ubiquitinación máxima (78). Dentro de las posibles quinasas candidatas a fosforilar este dominio, un gran número de estudios han demostrado que GSK-3 es capaz, mediante la fosforilación del dominio  $DSGX_{(1-4)}S$ , de dirigir la ubiquitinación y posterior degradación proteasómica de varias proteínas como Snail (240),  $\beta$ -catenina (1, 127, 164), Cdc25a (111), Gli2 y Gli3 (163, 214), Xom (241), FGD1 y FGD3 (79-80), Mcl-1 (47), securina (132) y la fosfatasa PHLPP1 (130).

## ***OBJECTIVES/OBJETIVOS***



## Objetives

---

### 1 Study of pharmacological regulation of Nrf2.

- 1.1 *Analysis of the signaling pathways involved in the regulation of Nrf2 by bifunctional inducers, such as nordihydroguaiaretic acid (NDGA).*
- 1.2 *Relevance of GSK-3 in the regulation of Nrf2 by the inducers: NDGA, sulforaphane (SFN) and tert-butylhydroquinone (tBHQ).*

### 2 Study of the Nrf2 degradation pathway mediated by the GSK-3/ $\beta$ -TrCP axis.

- 2.1 *Description of the mechanism of the regulation of Nrf2 stability by GSK-3.*
- 2.2 *Characterization of the SCF/ $\beta$ -TrCP-mediated degradation of Nrf2.*
- 2.3 *Analysis of the putative domains of phosphorylation by GSK-3 and degradation by  $\beta$ -TrCP.*

### 3 Structural characterization of Nrf2/ $\beta$ -TrCP complex by Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

- 3.1 *Study of the interaction between Nrf2 peptides and the WD40 domain of  $\beta$ -TrCP.*
- 3.2 *Molecular modeling of the Nrf2/ $\beta$ -TrCP complex.*

### 4 Functional relevance of the GSK-3-induced degradation of Nrf2.

- 4.1 *Analysis of the antioxidant response mediated by Nrf2 in hippocampus from mice with a conditional depletion of neuronal GSK-3 $\beta$ .*
- 4.2 *Contribution of the Keap1 and GSK-3 regulatory pathways of Nrf2 in neuronal protection in a model of excitotoxicity caused by kainate.*

**1 Estudio de la regulación farmacológica de Nrf2.**

- 1.1 *Análisis de las vías de señalización implicadas en la regulación de Nrf2 por agentes inductores bifuncionales como el ácido nordihidroguayarático (NDGA).***
- 1.2 *Relevancia de la quinasa GSK-3 en la regulación de Nrf2 por los agentes inductores: NDGA, sulforafano (SFN) y tert-butilhidroquinona (tBHQ).***

**2 Estudio de la vía de degradación de Nrf2 dependiente de GSK-3/ $\beta$ -TrCP.**

- 2.1 *Descripción del mecanismo de regulación de la estabilidad de Nrf2 por GSK-3.***
- 2.2 *Caracterización de la degradación mediada por el complejo SCF/ $\beta$ -TrCP.***
- 2.3 *Análisis de los dominios putativos de fosforilación por GSK-3 y degradación por  $\beta$ -TrCP.***

**3 Análisis estructural del complejo de degradación Nrf2/ $\beta$ -TrCP por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).**

- 3.1 *Estudio de las interacciones entre péptidos de Nrf2 y el dominio WD40 de  $\beta$ -TrCP.***
- 3.2 *Modelado molecular del complejo Nrf2/ $\beta$ -TrCP.***

**4 Relevancia funcional de la vía de degradación de Nrf2 mediada por GSK-3.**

- 4.1 *Estudio de la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 en hipocampo de ratones con depleción condicional de GSK-3 $\beta$ .***
- 4.2 *Contribución de las vías de regulación de Nrf2 por Keap1 y GSK-3/ $\beta$ -TrCP en la protección neuronal en un modelo de excitotoxicidad producida por kainato.***



## ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## Materiales

---

### 1 Productos.

#### 1.1 Cultivos celulares.

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), y PBS (*Phosphate Buffered Saline*) fueron preparados por el Servicio de Medios de Cultivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas; sueros, tripsina y pen-strep (Gibco-Invitrogen); gentamicina (Genta Gobens), material plástico (Nunc, Falcon y Sarstedt).

#### 1.2 Manipulación y obtención del DNA.

Antibióticos: ampicilina y kanamicina (Sigma). Preparación de DNA plasmídico: *Genopure Plasmid Maxi Kit* (Roche Applied Science). Digestiones de los plásmidos: enzimas de restricción (Invitrogen, Fermentas, Roche y New England Biolabs). Electroforesis de DNA: agarosa (Biotools) o agarosa de bajo punto de fusión (BioWhittaker). Marcadores de peso molecular: DNA  $\lambda$ HindIII (Invitrogen). Purificación de DNA a partir de banda en gel de agarosa: "*GeneClean Kit*" (QBiogen).

#### 1.3 Electroforesis monodimensional y bidimensional de proteínas, transferencia e inmunodetección.

Marcadores de peso molecular "*Bench Mark protein ladder*" (Invitrogen), TEMED, persulfato amónico, acrilamida y bisacrilamida (Bio-Rad), membranas Immobilon-P (Millipore), ECL Advance (GE Healthcare). Todos los reactivos para los geles bidimensionales son reactivos de alta calidad de la gama Plus One de GE Healthcare.

#### 1.4 Isótopos.

[ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP (3000 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech).

[ $^{35}\text{S}$ ]-metionina/[ $^{35}\text{S}$ ]-cisteína (NEG 772 EasyTag Express protein labeling mix de Perkin Elmer).

#### 1.5 Extracción de RNA y RT-PCR.

TRIzol (Invitrogen), GoTaq Polimerasa, tampón de PCR (Promega), RNA to cDNA Kit, SyBR Green, placas de PCR (Applied Biosystem), cloroformo, isopropanol (Merck).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.6 Determinación de actividad luciferasa.

*Luciferase Assay System* y *Dual Luciferase Assay System* (Promega).

### 1.7 Determinación de las vidas medias de proteínas.

Cicloheximida (Boehringer Mannheim).

### 1.8 Determinación de actividad lactato deshidrogenasa.

*Cytotoxicity Detection Kit* (LDH) (Roche Applied Science).

El resto de los productos comerciales con calidad analítica fueron suministrados por Bio-Rad, GE Healthcare, Invitrogen, Roche, Merck, Panreac, Promega y Sigma entre otros.

## 2 Anticuerpos.

### 2.1 Anticuerpos primarios.

**Anti-Akt1(C20)** (Santa Cruz): Anticuerpo policlonal de cabra que reconoce un epítipo del extremo C-terminal de Akt1. Reconoce la proteína humana, de ratón y de rata.

**Anti-fosfo-Akt (Ser473)** (Cell signaling): Anticuerpo monoclonal de conejo generado contra la serina 473 fosforilada de Akt de ratón. Reconoce la proteína de ratón.

**Anti- $\beta$ -actina** (Santa Cruz): Anticuerpo policlonal de cabra que reconoce el extremo C-terminal de la  $\beta$ -actina humana. Reconoce la proteína humana, de rata y de ratón.

**Anti- $\beta$ -catenina** (BD Transduction): Anticuerpo monoclonal de ratón generado contra el extremo C-terminal (aminoácidos 571-781) de  $\beta$ -catenina murina. Reconoce la proteína de ratón, rata, humano, pollo y perro.

**Anti-ERK1/2** (Cell signaling): Anticuerpo monoclonal de conejo generado contra el extremo C-terminal de ERK1/2 de rata. Reconoce la proteína de humano, ratón, rata, hámster, mono, pollo, *D. melanogaster*, pez cebra, vaca, perro, cerdo y *C. elegans*.

**Anti-fosfo-ERK1/2** (Cell signaling): Anticuerpo monoclonal de ratón que detecta niveles endógenos de ERK 1 y 2 cuando se encuentra fosforilado en la Thr202 y Tyr204 de ERK1 y en la Thr185 y Tyr187 de ERK2. Reconoce la proteína de humano, ratón, rata, hamster, mono, visón, *D. melanogaster*, pez cebra, vaca y cerdo.

**Anti-Flag M2** (Sigma-Aldrich): Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la etiqueta Flag, cuya secuencia es: DYKDDDDK.

**Anti-GCLC/M** (Cedidos por Dra. Terrance J. Kavanagh, University of Washington): Anticuerpos policlonales de conejo frente a las unidades catalíticas y moduladoras de la glutamil-cisteína ligasa o GCL. Reconocen la proteína de ratón.

**Anti-GFP** (Sigma): Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la proteína verde fluorescente (GFP). Reconoce también las versiones amarilla fluorescente (EYFP) y cian fluorescente (CFP).

**Anti-Gliceraldehído-3-Fosfato-Deshidrogenasa** (GAPDH) (Merck): Anticuerpo monoclonal de ratón generado contra la GAPDH de músculo de ratón. Reconoce la proteína de ratón, rata, humano, conejo, cerdo, perro, pollo, pez y rana.

**Anti-GSK-3 $\alpha/\beta$**  (Biosource): Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce ambas isoformas de GSK-3. Es específico de humano, ratón y rata.

**Anti-GSK-3 $\beta$**  (BD Transduction): Anticuerpo monoclonal de ratón generado contra el fragmento N-terminal de GSK-3 $\beta$  de rata. Reconoce la proteína de rata, ratón, humano, pollo y perro.

**Anti-fosfo-GSK-3 $\beta$  (Ser9)** (Cell signaling): Anticuerpo polyclonal de conejo producido contra la fosfoserina 9 de GSK-3 $\beta$  humana. Reconoce la proteína de humano, ratón y rata.

**Anti-fosfo-GSK-3 $\beta$  (Thr390)** (Cell signaling): Anticuerpo polyclonal de conejo generado contra la fosfotreonina 390 de GSK-3 $\beta$  humana. Reconoce la proteína de humano.

**Anti-GSTM5** (Cedido por el Dr. J. D. Hayes, Biomedical Research Centre, Ninewells Hospital and Medical School, University of Dundee, Dundee, UK): Anticuerpo policlonal de conejo frente a glutathione S-transferasa  $\mu$ 5. Reconocen la proteína de ratón.

**Anti-HA** (Covance): Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce el epítipo hemaglutinina (HA) del virus *Influenza*, compuesto por los siguientes aminoácidos: YPYDVPDYA.

**Anti-HO-1** (Millipore): Anticuerpo policlonal de conejo que reconoce HO-1. Reconoce la proteína de rata, ratón y vaca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Anti-Keap1 (H190)** (Santa Cruz): Anticuerpo policlonal de conejo que reconoce Keap1 de origen humano. Reconoce la proteína de ratón, rata y humano.

**Anti-Lamina B1** (Santa Cruz): Anticuerpo policlonal de cabra que reconoce el extremo C-terminal de la Lamina B1 de origen murino. Reconoce la proteína Lamina B1 de ratón, rata y humano. También reconoce la Lamina B2 y B3 de ratón, rata y humano.

**Anti-Myc** (Santa Cruz): Anticuerpo monoclonal de ratón generado contra el extremo C-terminal (aminoácidos 408-439) de c-Myc de origen humano. Reconoce la proteína c-Myc p67 de ratón, rata, humano, mono, gato y perro. Recomendado también para el reconocimiento de proteínas fusionadas a la etiqueta Myc (aminoácidos 408-439 de la proteína completa).

**Anti-Nrf2** (Cedido por el Dr. J. D. Hayes). Anticuerpo policlonal de conejo que reconoce Nrf2 de ratón.

**Anti-NQO1** (Abcam): Anticuerpo policlonal de cabra que detecta la proteína NQO1. Reconoce la proteína de rata, ratón y humano.

**Anti-p38 MAPK** (Cell signaling): Anticuerpo policlonal de conejo generado contra la proteína p38 MAPK humana. Reconoce la proteína p38 MAPK de humano, ratón, rata, mono, pollo y cerdo de Guinea.

**Anti-fosfo-p38** (Cell signaling): Anticuerpo policlonal de conejo que detecta niveles endógenos de p38 MAPK cuando se encuentra fosforilado en la Thr180 y/o la Tyr182. Reconoce la proteína de humano, ratón, rata, hámster, mono, *D. melanogaster*, pez cebra, vaca, cerdo y *S. cerevisiae*.

**Anti-SAPK/JNK** (Cell signaling): Anticuerpo policlonal de conejo generado contra la proteína JNK2 de humano. Reconoce SAPK/JNK de humano, ratón, rata, hámster, pez cebra, vaca y *S. cerevisiae*.

**Anti-fosfo-SAPK/JNK** (Cell signaling): Anticuerpo monoclonal de conejo que reconoce SAPK/JNK en el caso de que se encuentre fosforilado en la Thr183 y en la Tyr185. Reconoce las proteínas de humano, ratón, rata y hámster.

**Anti- $\beta$ -TrCP** (Invitrogen): Anticuerpo monoclonal de ratón generado contra la proteína humana recombinante de  $\beta$ -TrCP. Reconoce proteína de ratón y humano.

**Anti-Ubiquitina** (Chemicon): Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la molécula de ubiquitina conjugada y no conjugada. Reconoce la proteína de humano, ratón y rata.

**Anti-V5** (Invitrogen): Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la etiqueta V5, compuesta por los siguientes 14 aminoácidos: GKPIPNPLLGLDST.

## 2.2 Anticuerpos secundarios.

Los correspondientes anticuerpos secundarios, acoplados a peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase, HRP*), fueron suministrados por Santa Cruz y Amersham Pharmacia Biotech.

Para el caso de las inmunoprecipitaciones, como anticuerpo secundario se utilizó Mouse IgG TrueBlot (eBiosciences) (1:10.000) porque reduce la interferencia con las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos utilizados en la inmunoprecipitación.

## 3 Plásmidos.

### 3.1 Plásmidos de Nrf2.

- pcDNA3.1-mNrf2-V5/HisB: Plásmido que contiene la versión salvaje de Nrf2, con etiqueta de V5 en posición carboxiterminal. Cedido por el Dr. J. D. Hayes.
- pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5/HisB: Plásmido que contiene la versión de Nrf2 insensible a Keap1, con etiqueta de V5. Incluye una delección de los residuos <sup>79</sup>ETGE<sup>82</sup>, responsables de su unión a Keap1. Cedido por el Dr. J. D. Hayes.
- pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5/HisB: Esta construcción, además de tener delecionado el dominio de unión a Keap1, incluye seis mutaciones puntuales S335A, S338A, S342A, S347A, S351A y S355A en el dominio Neh6 de Nrf2. Fue generado utilizando el kit *GeneTailor™ site directed mutagenesis system* (Invitrogen) utilizando pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE 3S/3A</sup>-V5/HisB como molde y los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2.
- pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE 3S/3A</sup>-V5/HisB: Vector intermedio para la generación del mutante con las seis serinas mutadas a alaninas. Este plásmido contiene tres mutaciones mutuales en S347A, S351A y S355A. Fue generado en dos amplificaciones por PCR secuenciales utilizando los siguientes oligonucleótidos: *Directo* (PCR1), 5'-GAGCGGCCCCAGAGCATGCCGTGGAGTCTGCCATTTACGG-3' and *Reverso* (PCR1), 5'-CGATCTCGAGGCCACTGTGCTGGAT-3'; *Directo* (PCR2), 5'-

## MATERIALES Y MÉTODOS

CGATCATATGATGGACTTGGAGTTG-3' and *Reverso* (PCR2), 5'-CCGTAAATGGCAGACTCCACGGCATGCTCTGGGGCCGCTC-3' (las mutaciones están subrayadas).

- pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE 2S/2A</sup>-V5/HisB: Plásmido que incluye dos mutaciones puntuales en S335A y S338A del dominio Neh6 de Nrf2. Fue generado utilizando el kit *GeneTailor™ site directed mutagenesis system* utilizando pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5/HisB como molde y los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2.

- pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE 4S/4A</sup>-V5/HisB: Vector de expresión que contiene cuatro mutaciones puntuales en S335A, S338A, S342A y S347A del dominio Neh6 de Nrf2. Fue generado usando el kit *GeneTailor™ site directed mutagenesis system* utilizando pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE 2S/2A</sup>-V5/HisB como molde y los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2.

- pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5: Versión de Nrf2 insensible a Keap1 que carece de la etiqueta de seis histidinas. Utilizando el kit *GeneTailor™ site directed mutagenesis system*, se introdujo una mutación que cambia un residuo de histidina (CAT) por un codon de terminación (TAA) sobre el vector original pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5/HisB con los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2.

- pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5: Versión de Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup> que carece de la etiqueta de seis histidinas. Utilizando el kit *GeneTailor™ site directed mutagenesis system*, se introdujo una mutación que cambia un residuo de histidina (CAT) por un codon de terminación (TAA) sobre el vector original pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5/HisB con los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2.

- pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE ΔNeh6</sup>-V5: Plásmido de Nrf2 que posee una delección del dominio de unión a Keap1 (residuos ETGE) y del dominio Neh6 (aminoácidos 329-379). Cedido por el Dr. J. D. Hayes.

- Mutantes de delección de Nrf2 fusionados a proteína amarilla fluorescente EYFP: Se utilizó el vector pEYFP-C1 que contiene la proteína EYFP para clonar los fragmentos de Nrf2. pEYFP-Nrf2 Δ1-V5 fue generado subclonando el fragmento de Nrf2 flanqueado por los sitios BglII y PmeI entre los sitios BamHI y SmaI de pEYFP-C1. El resto de mutantes de delección fueron generados utilizando pEYFP-Nrf2 Δ1-V5 como molde con el kit *GC-Rich PCR system* (Roche Applied Science). Las delecciones fueron generadas con un oligonucleótido reverso común: 5'-TCAGAAAGCCATAGAGCCCACCGCAT-3'. Los oligonucleótidos directos fueron los siguientes: Δ2, 5'-TAACGGATCCTTCATAGCAGAGCCCAGTGAC-3'; Δ3, 5'-TAACGGATCCAAAGCTTTCAACCCGAAGCAC-3'; Δ4, 5'-TAACGGATCCCAGAACGGCCCTAAAGCACAG-3', y Δ5, 5'-TAACGGATCCAAAAATCATTAACCTCCCTGTT-3'. Los fragmentos amplificados fueron



digeridos con BamHI (subrayado) y con PmeI, y clonados en pEYFP-CI entre los sitios BglII y SmaI.

- EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 y EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 6S/6A-V5: Construcciones que contienen un fragmento de 55 aminoácidos de Nrf2 murino fusionados a la proteína EYFP. Fueron generados utilizando los siguientes oligonucleótidos: directo 5'-TAACAGATCTGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTC-3' y reverso 5'-TAACAGATCTATCTAGCTCCTCCATTTCCGAGTCACT-3' y como molde pEYFP-mNrf2  $\Delta$ 1-V5 y pEYFP-mNrf2  $\Delta$ 1 6S/6A-V5, respectivamente. Los sitios BglII subrayados se incluyeron en ambos oligonucleótidos para permitir la religación del producto de amplificación.

- EYFP-Nrf2<sup>(317-372)</sup> 2S/2A-V5: Plásmido que incluye dos mutaciones puntuales S335A y S338A en el dominio Neh6 de Nrf2. Fue generado utilizando el kit *GeneTailor™ site directed mutagenesis system* utilizando EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 como molde y los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2.

- EYFP-Nrf2<sup>(317-372)</sup> 4S/4A-V5: Construcción que contiene cuatro mutaciones puntuales S335A, S338A, S342A y S347A en el dominio Neh6 de Nrf2. Fue generado utilizando el kit *GeneTailor™ site directed mutagenesis system* utilizando EYFP-Nrf2<sup>(317-372)</sup> 2S/2A-V5 como molde y los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2.

- EYFP-Nrf2<sup>(317-372)</sup> S342A/S347A-V5: EYFP-Nrf2<sup>(317-372)</sup> que incluye dos mutaciones puntuales S342A y S347A en el dominio Neh6 de Nrf2. Fue generado utilizando el kit *GeneTailor™ site directed mutagenesis system* utilizando EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 4S/4A-V5 como molde y los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2.

- CFP-Nrf2<sup>(2-101)</sup>: Plásmido que contiene el dominio Neh2 de Nrf2 fusionado a la proteína cian fluorescente (CFP). Fue generado amplificando por PCR el fragmento 2-101 de Nrf2 a partir de pcDNA3.1-mNrf2-V5/HisB con los siguientes oligonucleótidos: Directo 5'-TAACAAGCTTTGGATTTGATTGACATC-3' y Reverso 5'-TAACAAGCTTCTACATACAGTCTTCAAA-3'. Los sitios HindIII subrayados fueron introducidos para clonar este fragmento en los sitios HindIII del vector pCFP-C1.

- EGFP-Nrf2<sup>(306-483)</sup>: Plásmido que contiene el dominio Neh6 de Nrf2 fusionado a la proteína verde fluorescente (EGFP). Se amplificó el fragmento 306-483 de Nrf2 utilizando los siguientes oligonucleótidos: Directo 5'-TAACCTCGAGGGACTATTGAAGGCTGT-3' y Reverso 5'-TAACGGATCCTTAATTGAATTGCTCCTT-3' usando pcDNA3.1-mNrf2-V5/HisB como molde. Los sitios XhoI y BamHI fueron añadidos para introducir este fragmento en los mismos sitios del vector pEGFP-C1.

- pET15b-mNrf2: El vector pET-15b porta una cola de histidinas N-terminal que fusionadas a Nrf2 permiten su purificación a partir de bacterias E. Coli BL21(DE3). Cedido por el Dr. J. D. Hayes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- pET15b-mNrf2<sup>6S/6A</sup>: Plásmido para la expresión y purificación de mNrf2<sup>6S/6A</sup> a partir de bacterias E. Coli BL21(DE3). Fue generado digiriendo el vector pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE 6S/6A-V5/HisB</sup> con NdeI y XhoI y clonando el fragmento resultante en los mismos sitios del vector pET15b.

### 3.2 Plásmidos de GSK-3β.

- pCGN-HA-GSK-3β<sup>Y216F</sup>: Plásmido que contiene una versión catalíticamente inactiva de GSK-3β, dado que tiene mutado el residuo Y216, responsable de la activación de la enzima. Posee una etiqueta HA. Fue cedido por el Dr. A. Kikuchi (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hiroshima University, Japón).

- pCGN-HA-GSK-3β<sup>Δ9</sup>: Plásmido que contiene una versión constitutivamente activa de GSK-3β. Los primeros 9 aminoácidos han sido deletados y por tanto no puede ser fosforilada la serina 9 responsable de su inhibición. Tiene una etiqueta HA. Plásmido cedido también por el Dr. A. Kikuchi.

- pcDNA3-GSK-3β<sup>S9A</sup>-HA: Plásmido que contiene la mutación puntual del residuo 9, de serina a alanina, para generar una versión mutada de GSK-3β constitutivamente activa. Posee una etiqueta HA. Fue cedido por el Dr. R. Jope (Dept. of Psychiatry, University of Alabama, Birmingham, AL, EEUU).

### 3.3 Plásmidos de β-TrCP.

- pcDNA3-Flag-β-TrCP1/2: Vectores de expresión de las dos isoformas de β-TrCP humano, β-TrCP1 y β-TrCP2, ambos con etiqueta Flag aminoterminal. Estos vectores fueron cedidos por el Dr. T. Chiba (Department of Molecular Biology, University of Tsukuba, Japón).

- pcDNA3-β-TrCP<sup>ΔFbox</sup>-HA: Plásmido que codifica la versión dominante negativa de β-TrCP, con una etiqueta HA. Posee una delección del dominio Fbox, responsable de su asociación con Skp1 para mantener complejos SCF/β-TrCP de degradación funcionales. Construcción cedida por el Dr. S. Y. Fuchs (Department of Animal Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, EEUU).

- pcDNA3-Flag-β-TrCP1<sup>R285E</sup>, pcDNA3-Flag-β-TrCP1<sup>R410E</sup>, pcDNA3-Flag-β-TrCP1<sup>R431E</sup>, pcDNA3-Flag-β-TrCP1<sup>R474E</sup> y pcDNA3-Flag-β-TrCP1<sup>R521E</sup>: Plásmidos que llevan mutados los residuos de arginina indicados a glutámico en el dominio WD40 de β-TrCP1. Estos residuos han sido previamente descritos como fundamentales en la interacción de β-TrCP





con sus sustratos. Cada uno de estos mutantes fueron generados utilizando el kit GeneTailor™ site directed mutagenesis system (Invitrogen) utilizando pcDNA3-Flag-β-TrCP1 como molde y los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2.

### 3.4 Plásmidos de Keap1.

- pcDNA3.1-Keap1-V5/HisC: Plásmido que codifica Keap1 con una etiqueta V5. Cedido por el Dr. J. D. Hayes.
- pcDNA3.1-Keap1-HA/HisC: Plásmido que codifica Keap1 con una etiqueta HA. Esta construcción fue generada reemplazando la etiqueta V5 del plásmido pcDNA3.1-Keap1-V5/HisC por una etiqueta HA, con los siguientes oligonucleótidos: Directo 5' - CGAGCGATCGTTCGACATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTCTAGATATCAAG-3' y Reverso 5'- CCGGCTTGATATCTAGAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGTTCGACGATCGC-3', que fueron previamente anillados. Este fragmento se introdujo en los sitios AgeI y XhoI de pcDNA3.1-Keap1-V5/HisC. Los sitios XbaI subrayados fueron introducidos en ambos oligonucleótidos como control del clonaje.

### 3.5 Otros plásmidos.

- ARE-LUC: Vector de expresión que contiene tres secuencias en tándem de los elementos de respuesta antioxidante (ARE) del promotor *Hmox1* controlando el gen de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*). Cedido por el Dr. J Alam (Department of Molecular Genetics, Ochsner Clinic Foundation, New Orleans, USA).
- pTK-Renilla: Plásmido utilizado como control para los ensayos de luciferasa. Contiene el gen de la luciferasa de pensamiento de mar (*Renilla reniformis*), asociado al promotor de timidina quinasa de *Herpes Simplex Virus* (HSV) para la expresión constitutiva del gen en células de mamífero.
- pHis-Ub: Plásmido que codifica la molécula de ubiquitina fusionada a una cola de histidinas para su purificación. Cedido por el Dr. J. D. Hayes.
- pEGFP-C1, pEYFP-C1 y pCFP-C1: Plásmidos que codifican las proteínas verde, amarilla o cian fluorescentes, respectivamente.

## 4 Péptidos.

- **4P-hNrf2**. Péptido que comprende los residuos 333-362 de la secuencia humana de Nrf2. Posee cuatro residuos de serina fosforilados en las posiciones 344, 347, 351 y 356. Fue sintetizado por Invitrogen.

- **2P-hNrf2.** Péptido que comprende los residuos 333-359 de la secuencia humana de Nrf2. Posee dos residuos de serina fosforilados en las posiciones 344 y 347. Fue sintetizado por JPT Innovative Peptide Solutions.

La pureza de ambos péptidos se determinó por HPLC siendo superior al 95%. Ambos péptidos están modificados en sus extremos por N-acetilaciones y C-amidaciones.

## **5 Tampones y soluciones.**

### **5.1 Tampones generales.**

El medio LB (Luria-Bertani) para cultivos bacterianos, las placas de LB agar para crecimiento de bacterias, los tampones PBS (tampón fosfato salino), Tris-HCl 1 M pH 6.8 y pH 7.5, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, HEPES 1 M pH 7.5, SDS 10% y EDTA 0.5 M pH 8.0 fueron proporcionados por el Servicio de Medios de Cultivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” UAM-CSIC.

### **5.2 Tampón de carga para electroforesis SDS-PAGE 5X.**

50 mM Tris HCl, pH 6.8, 10 % glicerol, 2 % SDS, 0.1 % azul de bromofenol y 150 mM  $\beta$ -mercaptoetanol.

### **5.3 Tampón TTBS.**

50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20.

### **5.4 Tampón de lisis.**

1 % NP-40, 10 % glicerol, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1  $\mu$ g/ml leupeptina, 1 mM PMSF, 20 mM NaF, 1 mM pirofosfato sódico, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ .

### **5.5 Tampones de carga de DNA.**

1 % Azul de bromofenol, 30 % glicerol en tampón TAE. Preparado según se indica en el manual de Sambrook *et al.* (186).

## **6 Estirpes bacterianas.**

Las cepas de *E.coli*, DH5- $\alpha$  y BL21(DE3), competentes para transformación fueron proporcionadas por el Servicio de Medios del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” UAM-CSIC.

## 7 Líneas celulares.

### 7.1 HEK293T.

Línea celular procedente de células embrionarias humanas de riñón. Fue generada en 1987 en el laboratorio de la Dra. Michele P. Calos (Universidad de Standford, EEUU) a partir de la línea HEK293 en la cual fue insertado de manera estable el gen transformante antígeno T del virus SV40. De esta manera, los plásmidos que contienen el origen de SV40 son replicados en un alto número de copia, entre 400 y 1000 plásmidos por célula, con lo que se consigue un alto nivel de expresión. Esta característica hace que sean unas células apropiadas para la realización de transfecciones transitorias con alta eficiencia.

### 7.2 *Fibroblastos embrionarios procedentes de ratones deficientes en Keap1 (Keap1<sup>-/-</sup>) y fibroblastos embrionarios procedentes de ratones silvestres (Keap1<sup>+/+</sup>).*

Fibroblastos embrionarios inmortalizados por pase procedentes de ratones deficientes en Keap1 y de sus ratones silvestres. Fueron establecidos en el laboratorio del Dr. K. Itoh (Center for Advanced Medical Research, Hirosaki University, Graduate School of Medicine, Japón).

### 7.3 *Fibroblastos embrionarios procedentes de ratones deficientes en Nrf2 (Nrf2<sup>-/-</sup>) y fibroblastos embrionarios procedentes de ratones silvestres (Nrf2<sup>+/+</sup>).*

Fibroblastos embrionarios primarios procedentes de ratones deficientes en Nrf2 y de sus ratones silvestres. Fueron establecidos en el laboratorio del Dr. Antonio Cuadrado por la Dra. Isabel Lastres-Becker.

### 7.4 Neuro2A (N2A).

Células procedentes de neuroblastoma de ratón. Esta línea celular fue establecida por R.J. Klebe y F.H. Ruddle a partir de un tumor espontáneo de una cepa de ratón A albino.

## 8 Animales.

### 8.1 *Ratones macho Nrf2<sup>-/-</sup>/C57BL6J y sus correspondientes ratones silvestres, Nrf2<sup>+/+</sup>/C57BL6J.*

Fueron cedidos por el Dr. M. Yamamoto, Universidad de Tohoku, Sendai, Japón. Los ratones Nrf2<sup>-/-</sup>/C57BL6J contienen un *cassette* lacZ-neo reemplazando un segmento de

1.2 kb del exón 5 de Nrf2. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo con las guías institucionales del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” y de la Universidad Autónoma de Madrid.

## 8.2 Ratones deficientes en GSK-3 $\beta$ (+Cre) y sus controles (-Cre).

Ambas estirpes fueron generadas en el laboratorio del Dr. F. Van Leuven utilizando el sistema Cre/lox como se describe en (103). Los ratones transgénicos con el gen de GSK-3 $\beta$  flanqueado por dos sitios loxP fueron cruzados con ratones que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor del gen Thy. Los ratones que poseen los dos alelos de GSK-3 $\beta$ -loxP pero que no expresan la recombinasa Cre (-Cre) fueron utilizados como controles. Los doble transgénicos que expresan la recombinasa y son deficientes en GSK-3 $\beta$  sólo en neuronas son los denominados +Cre. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo con las guías institucionales de la Universidad KULeuven (Bélgica).

En todos los casos, los ratones se mantuvieron a temperatura ambiente con ciclos de luz/oscuridad cada 12 h y proporcionándoles agua y comida *ad libitum*.

## Métodos

---

### 1 Cultivos celulares.

Las células HEK293T y N2A se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal y 80  $\mu$ g/ml del antibiótico gentamicina. Los MEFs se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 0.5 U/ml penicilina y 0.5  $\mu$ g/ml estreptomicina. Todos los cultivos se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad relativa (95 %), CO<sub>2</sub> (5 %) y temperatura (37 °C).

### 2 Transfecciones transitorias.

Las transfecciones transitorias en HEK293T se realizaron mediante el método de transfección con fosfato cálcico. Para los experimentos de asociación y ubiquitinación *in vivo* se realizaron con el reactivo *Hekfectin Cell Line Specific Lipid* (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las transfecciones transitorias en N2A se realizaron con el reactivo *TransFast Transfection Reagent* (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### 3 Preparación de lisados celulares.

Las células se mantuvieron en bajo suero (0,5 % suero fetal bovino) durante las 16 h anteriores a los tratamientos. Después fueron lavadas dos veces con PBS a 4 °C y se lisaron en un volumen adecuado de tampón de lisis utilizando un raspador de goma. Los lisados se sonicaron y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 16.000 g durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, los lisados se hirvieron durante 5 min.

### 4 Electroforesis e inmunodetección.

La electroforesis de proteínas se realizó siguiendo el método descrito en (126). La cantidad de proteína en los lisados se determinó utilizando el *kit D<sub>c</sub> Protein Assay* de Bio-Rad. Las proteínas, una vez separadas en gel de poliacrilamida, se transfirieron mediante un sistema de transferencia húmeda a membranas Immobilon-P de 0.45 µm. Para la inmunodetección, los filtros fueron hidratados con metanol durante 1 min, después lavados con tampón TTBS (*Tween-Tris buffered saline*) durante 3 min y bloqueados durante 2 h en una solución de tampón TTBS con un 4 % de BSA. Las membranas fueron incubadas 2 h con el anticuerpo primario en TTBS con 0.4 % de BSA a la dilución adecuada. Tras tres lavados de 10 min con tampón TTBS, las membranas fueron incubadas durante 1 h con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, diluido 1:10.000 en TTBS con 0.4 % de BSA. Las membranas se revelaron utilizando un ECL (*enhanced chemiluminescence*) comercial tras realizar tres lavados de 10 min con tampón TTBS.

### 5 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE).

La electroforesis bidimensional es una técnica que permite la separación de proteínas por punto isoelectrico y masa molecular. La separación se hace en dos etapas consecutivas. En la primera de ellas (primera dimensión) las proteínas son separadas en función de su carga a lo largo de un gel con gradiente de pH. Cada proteína avanza en el campo eléctrico hasta alcanzar un valor de pH igual a su punto isoelectrico. En una segunda etapa (segunda dimensión), estas proteínas son separadas en función de su masa molecular.

Las muestras fueron lisadas en 200 µl de tampón de lisis 2D (7 M urea, 2 M tiourea, 4 % (p/v) Chaps, 30 mM Tris-HCl, pH 7.5). Para los ensayos con fosfatasa λ, las células fueron lisadas en tampón de lisis (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 % NP-40, 10 % glicerol, 1 µg/ml leupeptina, 1 mM PMSF). Los lisados fueron sonicados y aclarados por centrifugación. 50 µl de los sobrenadantes de estas muestras fueron



incubados con fosfatasa  $\lambda$  (Upstate, Millipore) durante 4 h a 37 °C. A continuación, las proteínas se precipitaron usando el kit *2D Cleanup Kit* (GE Healthcare) y se resuspendieron en tampón de lisis 2D. 50  $\mu$ l de cada muestra se diluyeron en 300  $\mu$ l de tampón de rehidratación 2D (7 M urea, 2 M tiourea, 4 % (p/v) Chaps, 50 mM ditiotreitól, y 1 % (v/v) tampón IPG 4–7). Las muestras fueron cargadas en tiras con un gradiente de pH 4–7, *pH gradient Immobiline DryStrip gels 4–7* (GE Healthcare) e isoelectroenfocadas en un *IPGphor3 basic unit* (GE Healthcare) aplicando un total de 55 kV/h. Después, las tiras fueron equilibradas durante 10 min primero con un tampón con 2 % (p/v) DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 30 % glicerol, 5 % SDS y 0.05 % azul de bromofenol, y en segundo lugar con un tampón con 4 % (p/v) iodoacetamida, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 30 % glicerol, 5 % SDS y 0.05 % azul de bromofenol. Las tiras equilibradas fueron cargadas en un gel SDS-PAGE al 12 % para separar las proteínas en la segunda dimensión. Los geles fueron transferidos a membranas Immobilon-P, que fueron reveladas con anticuerpos anti-V5 o anti-EGFP.

## 6 Co-Immunoprecipitaciones.

Las células fueron lavadas con PBS y recolectadas por centrifugación a 1.100 rpm durante 10 min. El pellet fue resuspendido en 0.45 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % deoxicolato de sodio, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptina). Los lisados se incubaron con los anticuerpos indicados en cada caso, durante 2 h a 4 °C con agitación rotacional constante. A continuación se incubaron durante 1 h en las mismas condiciones con proteína *G-sepharose* para permitir la sedimentación de los inmunocomplejos. Los complejos fueron recolectados por centrifugación a 13.000 rpm y lavados consecutivamente con tampón de lisis, tampón de lavado 1 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.05 % deoxicolato de sodio, 1 mM PMSF y 1  $\mu$ g/ml leupeptina) y tampón de lavado 2 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 % NP-40, 0.05 % deoxicolato de sodio, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptina). Las muestras fueron hervidas, resueltas por electroforesis SDS-PAGE y analizadas con los correspondientes anticuerpos.

## 7 Ensayos de fosforilación *in vitro*.

Los ensayos de fosforilación *in vitro* fueron realizados utilizando como sustrato proteínas recombinantes de Nrf2 purificadas a partir de bacterias. Para los ensayos con Nrf2 recombinante, las diferentes versiones de la quinasa GSK-3 que se utilizaron fueron obtenidas mediante inmunoprecipitación de la mismas a través de su epítipo HA a partir de lisados de células HEK293T transfectadas previamente con HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup>, HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>, o HA-GSK-3 $\beta$ <sup>S9A</sup>. Para los ensayos de fosforilación *in vitro*, Nrf2 (0.5  $\mu$ g) fue incubado

con las diferentes quinasas y 5  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  en 25  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción quinasas (10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  ATP, 40 mM ácido morfolinpropansulfónico (MOPS) pH 7.0 y 1 mM EDTA) durante 30 min a 30 °C en agitación continua. Las reacciones quinasas fueron resueltas en geles de electroforesis SDS-PAGE, transferidos a membranas de Immobilon-P, que fueron expuestas en autorradiografías.

Para las reacciones de fosforilación de los mutantes de delección de Nrf2 fusionados a EYFP y para la preparación de Nrf2 fosforilado para los experimentos de ubiquitinación *in vitro*, las diferentes versiones de Nrf2 recombinante (0.5  $\mu\text{g}$ ) fueron fosforiladas utilizando 5 ng de GSK-3 $\beta$  activa recombinante (Upstate) por reacción en 25  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción quinasas durante 1 h a 30 °C en agitación continua. Un microlitro de las reacciones con Nrf2 fue utilizado para cada ensayo de ubiquitinación *in vitro*.

## **8 Ensayos de ubiquitinación.**

### **8.1 Ensayos de ubiquitinación *in vitro*.**

Las proteínas que forman el complejo de degradación SCF/ $\beta$ -TrCP fueron cedidas por el Dr. N. W. Pierce y el Dr. R. J. Deshaies (Howard Hughes Medical Institute, Division of Biology, Pasadena, CA). Las reacciones de ubiquitinación se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en (165). Cada reacción contiene ATP (2 mM), ubiquitina (30  $\mu\text{M}$ ), E1 (1  $\mu\text{M}$ ), Cdc34b (5  $\mu\text{M}$ ), SCF/ $\beta$ -TrCP (450 nM), y Nrf2 (20 ng) no fosforilado o fosforilado previamente en tampón de ubiquitinación (30 mM Tris pH 7.6, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ditiotretol, 100 mM NaCl). Los componentes E1, Cdc34b, y ubiquitina fueron preincubados juntos en tampón de ubiquitinación durante 2 min. Este paso es fundamental dado que el enlace covalente entre la ubiquitina y el sustrato proteico requiere la activación del grupo carboxilo terminal de la ubiquitina. Después se añadieron el resto de componentes y se incubaron durante 1 h más a 25 °C. Las reacciones se pararon añadiendo un tampón de carga de proteínas. Las reacciones de ubiquitinación fueron resueltas en geles SDS-PAGE seguido de una transferencia a membranas de Immobilon-P. Las proteínas ubiquitinadas fueron detectadas con un anticuerpo anti-ubiquitina (Chemicon, Millipore).

### **8.2 Ensayos de ubiquitinación *in vivo*.**

Estos experimentos fueron llevados a cabo siguiendo el método de Treier (210). Las células HEK293T fueron transfectadas con pHis-Ub junto a los plásmidos indicados en cada caso. Después de 24 h, las células se lavaron con PBS a 4 °C y se recogieron en 0.4 ml de PBS utilizando un raspador de goma. Se separaron 80  $\mu\text{l}$  de suspensión celular para

generar la fracción correspondiente a “lisado total”. A partir del resto, se purificaron las proteínas ubiquitinadas mediante columnas de resina de níquel, *ProBond™ Nickel-Chelating Resin* (Invitrogen). La resina contiene un agente quelante, ácido iminodiacético, que une iones  $\text{Ni}^{2+}$  a través de tres sitios de coordinación. De esta forma los iones de  $\text{Ni}^{2+}$  quedan unidos por 3 enlaces a la columna, haciendo muy difícil su separación. A través de los 3 enlaces restantes, se unen las proteínas con las colas de histidina que se quieren purificar. La suspensión celular fue lisada en 1 ml de tampón A (6 M hidrocloreuro de guanidina, 10 mM Tris en 0.1 M tampón fosfato, pH 8.0) suplementado con 5 mM imidazol. Los lisados resultantes fueron sonicados para reducir su viscosidad y se añadieron 60  $\mu\text{l}$  de resina *Probond*, previamente equilibrada con tampón A incubándolos en un agitador rotatorio durante 4 h a 25 °C. A continuación, los lisados fueron lavados secuencialmente con tampón A suplementado con 0.1% (v/v) Triton X-100; tampón B (8 M urea, 10 mM Tris en 0.1 M tampón fosfato, pH 8.0) suplementado con 0.1 % Triton X-100; tampón C (8 M urea, 10 mM Tris en 0.1 M tampón fosfato, pH 6.5) suplementado con 0.2 % Triton X-100, y finalmente, tampón C suplementado con 0.1 % Triton X-100. Las proteínas ubiquitinadas con His-Ub fueron eluidas de la resina con un tampón de carga de proteínas Laemmli modificado (20 mM Tris-Cl, pH 6.8, 10 % (v/v) glicerol, 0.8% (p/v) SDS, 0.1 % (p/v) azul de bromofenol, 0.72 M 2-mercaptoetanol y 300 mM imidazol). Posteriormente, las muestras fueron hervidas durante 4 min. Las muestras se centrifugaron (16.000 g, 1 min, 20 °C) y el sobrenadante resultante es lo que analizamos como fracción “pull-down”.

## 9 Silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia.

Los RNA de interferencia utilizados para silenciar la expresión de GSK-3 $\alpha$  o GSK-3 $\beta$  y el RNA control fueron adquiridos en Ambion Inc. (*Silencer® Select validated siRNA*, Applied Biosystems). Brevemente, las células HEK293T fueron sembradas en placas de 6 pocillos (200.000 células/pocillo en 2 ml de medio). Al día siguiente, las células fueron transfectadas mediante el método de fosfato cálcico con los vectores de expresión de Nrf2 o las diferentes versiones en su caso indicadas. Puesto que la vida media de GSK-3 es de 48 h (87), decidimos transfectar los siRNAs contra GSK-3 en dos días consecutivos para alcanzar el máximo silenciamiento posible. En el primer día, la expresión de ambas isoformas fue silenciada utilizando 80 ng del siRNA correspondiente y 30  $\mu\text{l}$  del reactivo de transfección *siPORT Amine reagent* (Ambion). En el segundo día, se utilizaron 40 ng de siRNA y 15  $\mu\text{l}$  de *siPORT Amine reagent*. Veinticuatro horas después, las células fueron recogidas y los niveles proteicos de Nrf2 y GSK-3 fueron analizados.

Los siRNAs utilizados para silenciar la expresión de  $\beta$ -TrCP1 y  $\beta$ -TrCP2 fueron suministrados por Thermo Scientific-Dharmacon y Applied Biosystems, respectivamente. Los fibroblastos embrionarios de ratones deficientes en Keap1 fueron sembrados en placas de 6 pocillos (200.000 células/pocillo en 2 ml de medio). En los dos días siguientes se llevaron a cabo las transfecciones de los siRNAs siguiendo el mismo protocolo arriba indicado. Veinticuatro horas después, las células fueron recogidas y los niveles proteicos de Nrf2 fueron analizados. En este caso, el grado de silenciamiento de  $\beta$ -TrCP1 y  $\beta$ -TrCP2 fue analizado por PCR cuantitativa a tiempo real con los oligonucleótidos Mm00477680\_ml y Mm00460241\_ml, respectivamente, de Applied Biosystems.

## 10 Análisis de la estabilidad de Nrf2 mediante marcaje con $^{35}\text{S}$ .

Las células HEK293T fueron sembradas ( $2 \times 10^6$  células/placa p100 previamente cubierta con poli-D-lisina) y transfectadas con los plásmidos indicados. Después de 24 h, fueron lavadas dos veces con medio de marcaje (DMEM sin metionina y sin cisteína suplementado con 10 % suero fetal bovino dializado y 80  $\mu\text{g/ml}$  gentamicina). A continuación, se incubaron las células en medio de marcaje durante 30 min a 37 °C. El medio fue retirado y reemplazado con medio de marcaje suplementado con 0.5 mCi/ml [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina/[ $^{35}\text{S}$ ]-cisteína durante 1 h. El medio fue retirado y las células lavadas dos veces con medio DMEM completo suplementado con 2 mM cisteína y 2mM metionina (20 veces en exceso). Las células se recogieron en los tiempos indicados excepto el punto “cero” que fue recogido rápidamente tras la hora de incubación con [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina/[ $^{35}\text{S}$ ]-cisteína. Para obtener los extractos, las células fueron lavadas con PBS y lisadas con tampón RIPA (*radioimmune precipitation assay*) (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 % NP-40, 1 % deoxicolato de sodio, 1 mM PMSF, 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina). Posteriormente, los lisados fueron diluidos 10 veces con tampón IP (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 20 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 % NP-40, 10 % glicerol, 10  $\mu\text{M}$  MG132, 1 mM PMSF y 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina) y sonicados. Los lisados se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se utilizó para inmunoprecipitar Nrf2-V5. Los lisados fueron incubados con 3  $\mu\text{l}$  de anticuerpo anti-V5 a 4 °C en rotación durante 2 h. Después, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de proteína G-sepharose por muestra y se incubaron durante 1 h más. Los inmunocomplejos fueron recogidos por centrifugación, lavados tres veces con tampón IP, y resuspendidos en 40  $\mu\text{l}$  de tampón de proteínas Laemmli con un 1 % de  $\beta$ -mercaptoetanol. Las muestras fueron hervidas, las proteínas separadas por electroforesis y transferidas a membranas de Immobilon-P. Estas membranas fueron expuestas en autorradiografías y luego reveladas con anticuerpo anti-V5 para normalizar la cantidad de Nrf2 total por calle.

## 11 Determinación de RNA mensajero mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

Se extrajo el RNA total de células HEK293T sembradas en placas de 60 mm de diámetro utilizando el método de TRIzol de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un  $\mu\text{g}$  de RNA total, cuantificado por espectrofotometría, se empleó para la reacción de síntesis de cDNA en 20  $\mu\text{l}$  usando el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems).

La reacción de PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en 10  $\mu\text{l}$  usando *Sybr Green Master Mix* (Applied Biosystems) y 5 pmoles de cada oligonucleótido específico (Tabla 3). La reacción se realizó en el equipo *StepOne* (Applied Biosystems). Tras una desnaturalización inicial de 95°C de 10 min, las condiciones de PCR fueron: 15 s a 95 °C (desnaturalización), 30 s a 60 °C (anillamiento) y 30 s a 60 °C (elongación). El análisis de curva de *melting* permitió mostrar la especificidad de los amplicones. El ciclo umbral, que es inversamente proporcional a la cantidad de cDNA amplificado, se midió como el número de ciclo a partir del cual la emisión fluorescente aparece por encima del fondo. Los niveles de mRNA fueron estimados mediante el método del  $\Delta\Delta\text{Ct}$  utilizando como referencia el gen de expresión constitutiva  $\beta$ -actina de ratón. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado.

Gene	Forward primers	Reverse primers
GSK-3 $\beta$	5'-AGAGATAAAGATGGCAGCAAGG-3'	5'-ATCCATTTCGAATCACTTTTCG-3'
GSK-3 $\alpha$	5'-ACAGCGGGAAGGTGACCACAGTG-3'	5' AAGTACCGCAGCCTCACAATA-3'
GSTM5	5'-GAGAAGCAGAAGCCAGAGT-3'	5'-ATACGATACTGGTCAAGAAT-3'
HO-1	5'-CACAGATGGCGTCACTTCGTC-3'	5'-GTGAGGACCCACTGGAGGAG-3'
GCLM	5'-TTACCGAGGCTACGTGTCAGAC-3'	5'-TATCGATGGTCAGGTCGATGTC-3'
GCLC	5'-AATCAGCCCCGATTTAGTCAGG-3'	5'-CCAGCTGTGCAACTCCAAGGAC-3'
$\beta$ -actin	5'-TCCTTCCTGGGCATGGAG-3'	5'-AGGAGGAGCAATGATCTTGATCTT-3'

**Table 3. Primers used in real time quantitative PCR.**

## 12 Ensayos de actividad luciferasa.

HEK293T sembradas en pocillos de placas de 24 pocillos se transfectaron transitoriamente mediante el método de fosfato cálcico. Tras 7 h fueron deprivadas de suero (0,5 %) durante 16 h. A continuación, las células se lisaron en 100  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (Promega) y 30  $\mu\text{l}$  de este lisado se empleó para el ensayo de actividad luciferasa, realizado según el protocolo descrito por el fabricante. La cuantificación se realizó en un

luminómetro *GloMax 96 microplate luminometer with dual injectors* de Promega. Cada reacción se realizó por triplicado procesándolas siempre como muestras independientes.

### 13 Ensayo de actividad lactato deshidrogenasa.

La medida de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) nos permite cuantificar la muerte celular. La LDH es una enzima que está presente en el citosol de las células vivas y se libera en el medio extracelular al permeabilizarse la membrana de las células dañada. La actividad LDH se midió usando el kit *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche Diagnostics) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La enzima LDH cataliza la reducción de  $\text{NAD}^+$  a NADH en presencia de L-lactato. La formación de NADH se puede medir acoplando una reacción en la que la sal de tetrazolium (INT) se reduce hasta formazán rojo. La cantidad e intensidad de color debido al formazán solubilizado puede medirse espectrofotométricamente a 490 nm. El porcentaje de toxicidad celular fue calculada utilizando la siguiente fórmula:  $100 \times (\text{liberación de LDH experimental}) / (\text{LDH total})$ . Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

### 14 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fue realizada en el laboratorio del Dr. Gildas Bertho (Universidad Paris-Descartes, París, Francia). Los diferentes experimentos fueron llevados a cabo a una frecuencia de resonancia o frecuencia de Larmor de 500.13 MHz para los átomos  $^1\text{H}$  en un espectrómetro Bruker AVANCE 500 conectado a una estación Linux con el programa Xwinnmr de Bruker. Las muestras se prepararon en tubos de 5 mm de vidrio de borosilicato o en tubos de 5 mm Shigemi, según el volumen de la muestra. Un tubo Shigemi es un tubo de RMN de tamaño microescala en comparación con los tubos habituales. Los tubos Shigemi son apropiados para experimentos de RMN de péptidos y proteínas donde se dispone un volumen de muestra pequeño consiguiendo una mayor concentración del péptido a analizar. La profundidad reducida de la muestra se ve compensada con vidrio sólido en el tubo de RMN por debajo del nivel de la muestra.

Los péptidos fueron preparados a una concentración de 1.6 mM en tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.2 preparado en 95 %  $\text{H}_2\text{O}$  y 5 %  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Para los experimentos de RMN con  $\beta$ -TrCP, el ratio péptido: $\beta$ -TrCP fue establecido en 98:1 (1.6 mM 4P-hNrf2 o 2P-hNrf2 y 17  $\mu\text{M}$  MBP- $\beta$ -TrCP). Los desplazamientos químicos de cada elemento fueron asignados en función del estándar interno que fue añadido a cada muestra, ácido 3-

(trimetilsilil)-propiónico-2,2,3,3-d<sub>4</sub>, sal sódica (TSP-d<sub>4</sub>). Los experimentos 1D <sup>1</sup>H, 2D TOCSY, 2D NOESY, 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC y 1D STD se realizaron a pH 7.2, a 280 K y 293 K.

Los espectros bidimensionales fueron analizados de acuerdo con los métodos States o TPPI (*Time-Proportional receiver Phase Incrementation*) (197), permitiéndonos eliminar del espectro sin señales indeseadas. Asimismo, en todos los experimentos de RMN de las muestras eliminamos la señal del solvente H<sub>2</sub>O/<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O 95:5 utilizando el método WATERGATE (170) o el método *Excitation Sculpting* (91) como técnicas de supresión de agua.

Los espectros 2D TOCSY (*Total Correlation spectroscopy*) fueron registrados utilizando una secuencia de bloqueo de espín que se logra con un tren de pulsos MLEV-17 o ciclo de desacoplamiento de Malcolm LEVitt (11) colocando al sistema en condiciones de mezcla isotrópica (todos los espines experimentan el mismo campo efectivo) con un tiempo de mezcla ( $\tau_m$ ) de 35 y 70 ms, respectivamente. Los espectros 2D NOESY fueron registrados utilizando un tiempo de mezcla ( $\tau_m$ ) de 100, 200 o 500 ms. Los espectros heteronucleares <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC fueron obtenidos en las mismas condiciones.

Los espectros <sup>1</sup>H STD (*Saturation Transfer Difference*) para analizar la interacción Nrf2- $\beta$ -TrCP fueron registrados a 500 MHz con 1024 escaneos y saturación selectiva de la resonancia de proteína a -3 ppm (frecuencia de irradiación *on* o acoplada). La frecuencia de irradiación desacoplada, frecuencia de irradiación *off*, fue de 30 ppm para el espectro de referencia. A esta frecuencia de irradiación acoplada no se encuentran resonancias de péptidos, mientras que el ancho de las señales de la proteína todavía permite que sea selectivamente y uniformemente saturada y por tanto, ser utilizado eficientemente para la técnica STD. A fin de lograr la selectividad deseada y evitar irradiación lateral, se emplearon para la saturación de las señales de la proteína una serie de 40 pulsos gaussianos de 50 ms igualmente espaciados (tiempo total de saturación ~2.05 s), con 1 ms de tiempo entre pulsos. Con una atenuación de 50 dB, la intensidad de campo de radiofrecuencia para los pulsos de saturación selectivos en todos los experimentos de STD fue de 190 Hz. Esta irradiación produjo la saturación completa de la proteína consiguiendo una difusión de espín eficiente. En cada pulso, el espectro se generó sustrayendo el espectro saturado del espectro de referencia vía *phase cycling*. Los valores relativos de STD fueron calculados dividiendo el valor de la intensidad de la señal en el espectro STD entre la intensidad correspondiente de la misma señal en el espectro de referencia <sup>1</sup>H 1D RMN obtenidos ambos en las mismas condiciones. El valor de STD máximo fue considerado como 100 % y el resto de intensidades fueron relativizadas a este valor.



Los espectros TRNOESY (*Transferred Nuclear Overhauser*, NOE transferido) de los péptidos 4P-hNrf2 o 2P-hNrf2 fueron registrados utilizando un tiempo de mezcla ( $\tau_m$ ) de 100, 200 o 500 ms.

## 15 Modelado molecular de la interacción Nrf2- $\beta$ -TrCP.

La modelización molecular permite a partir de los ensayos de RMN realizados generar estructuras tridimensionales del complejo proteína-ligando. Para ello, utilizamos las restricciones calculadas a partir de los picos NOE. Estos parámetros fueron incorporados dentro del programa ARIA 2.3 (134). ARIA introduce restricciones de distancia ambiguas dentro del proceso de cálculo de la estructura. En ARIA, el proceso lleva varias iteraciones y se inicia a partir de una lista de picos y de desplazamientos químicos obtenidos experimentalmente. Normalmente, en el ciclo 0, se genera una estructura inicial que sirve de “plantilla”, mientras que en las 8 iteraciones consecutivas se realiza la asignación de los picos NOE, su calibración y un análisis de las violaciones existentes respecto a los promedios de distancia interprotónicas calculados para los conformeros de energía más baja de la iteración anterior. Es decir, en cada ciclo se calibran y asignan los espectros NOESY. En la iteración final, un conjunto de estructuras de baja energía es presentado como las estructuras finales. Este conjunto de estructuras de péptidos fue seleccionado considerando la geometría correcta y la ausencia de violaciones de restricción de distancia mayores a 0.5 Å. El programa PyMOL (44) fue utilizado para el análisis y la presentación de las estructuras generadas. Finalmente, fueron realizados análisis de *docking* o acoplamiento utilizando Surflex-Dock 2.0 (SYBYL X 1.2, Tripos Certara Company). Surflex-Dock acopla ligandos flexible a un receptor rígido. Este programa usa una función de puntuación empírica para acoplar los péptidos de Nrf2 en el lugar de unión de los sustratos a  $\beta$ -TrCP. El primer paso consiste en introducir la estructura del complejo  $\beta$ -TrCP unido a un péptido de  $\beta$ -catenina que previamente ha sido validada por cristalografía de rayos X (Código PDB 1P22) (222). La estructura de la proteína se compone de la estructura tridimensional del complejo de  $\beta$ -TrCP-Skp1 humano. Para analizar el posible mecanismo de acción de Nrf2 sobre el complejo  $\beta$ -TrCP-Skp1, el siguiente paso fue remplazar el péptido de  $\beta$ -catenina por los obtenidos para Nrf2 en el sitio de unión a  $\beta$ -TrCP. Se generaron 30 modelos y se clasificaron según el valor de puntuación que representa la energía de interacción, siendo mejor estructura cuanto mayor sea dicho valor.



## 16 Determinación de los niveles de glutatión reducido y oxidado.

Los niveles de glutatión reducido (GSH) fueron medidos utilizando el siguiente método fluorimétrico. Los hipocampos fueron homogeneizados en 1 ml de tampón EDTA fosfato pH 8.0 suplementado con 300  $\mu$ l de  $\text{HPO}_3$  (25 %). A continuación, fueron centrifugados a 3.000 g durante 15 min para eliminar la presencia de proteínas. Separamos 500  $\mu$ l de cada sobrenadante y añadimos 500  $\mu$ l de tampón EDTA-fosfato suplementado con 100  $\mu$ l de o-ftalaldehído (OPA). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min en oscuridad. La cantidad de fluorescencia se detectó en un fluorímetro Synergy HT (Bio-Tek) a una longitud de onda de 350 nm (excitación) y 420 nm (emisión). Los valores fueron calculados por interpolación en una curva estándar de GSH, corregidos con la cantidad de proteína total y expresados como  $\mu$ g de GSH por mg de proteína.

La cuantificación de glutatión oxidado (GSSG) se determinó en 500  $\mu$ l de cada sobrenadante y se les añadió 100  $\mu$ l de ditioneitol (DTT) (25 mM) para reducir los puentes -SH y obtener la cantidad total de GSH. Así se incubaron durante 30 min a 4 °C. Posteriormente fueron centrifugadas a 5.000 g durante 10 min. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de GSH por el método descrito anteriormente y la concentración de GSSG fue obtenida por la sustracción de los valores de GSH a los de GSH total. Los valores son expresados como  $\mu$ g de GSSG por mg de proteína.

## 17 Determinación de los niveles de proteínas oxidadas.

El contenido de proteínas carboniladas en los hipocampos de los animales -Cre y +Cre fue determinado según el siguiente protocolo. Los tejidos homogeneizados en tampón EDTA fosfato fueron incubados durante 1 h con sulfato de estreptomicina y posteriormente centrifugados a 6.000 g para eliminar los ácidos nucleídos. Entonces, los sobrenadantes fueron tratados con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) (10 mM) disuelta en tampón fosfato-HCl (2N), y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante y en oscuridad. Posteriormente las proteínas fueron precipitadas con solución de TCA (ácido tricloroacético, 20 %) y centrifugadas a 3.000 g durante 10 min. Finalmente el precipitado fue resuspendido con hidrócloruro de guanidina (1M). El contenido de carbonilos fue calculado en función de la formación de proteína-hidrazona después de la reacción con DNPH, determinada a partir de la absorbancia a 370 nm (coeficiente de absorción molar =  $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). El contenido de proteínas carboniladas fue expresado como nmoles de carbonilo corregida por mg de proteína.

## 18 Determinación de los niveles de peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica fue determinada como la formación de malondialdehído (MDA). 200  $\mu$ L de los homogenados de hipocampo fueron añadidos sobre 300  $\mu$ L de solución TBA (0.375 g TBA (ácido tiobarbitúrico), 7.5 g ácido tricloroacético, 2.5 ml HCl) e incubados a 100 °C durante 30 min. Se mantuvieron las muestras 5 min en hielo y se centrifugaron a 3.000 g durante 15 min. La aparición de un cromóforo rosa indica la presencia de productos peroxidados. La concentración de lípidos peroxidados es directamente proporcional a la densidad del cromóforo. Las cantidades de MDA fueron determinadas por espectrofotometría a 532 nm y los valores calculados por interpolación en una curva estándar de MDA con 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Los resultados fueron calculados como nmoles de MDA corregidos por mg de proteína.

## 19 Obtención de las secciones de hipocampo y medición de estrés oxidativo y de muerte celular.

Los ratones fueron decapitados y cada cerebro fue rápidamente puesto en tampón de disección Krebs-bicarbonato pH 7.4 (120 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 26 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.18 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 11 mM glucosa y 200 mM sacarosa). Todas las cámaras de cultivo fueron burbujeadas con una mezcla gaseosa 95 %  $\text{O}_2$ /5 %  $\text{CO}_2$  durante 45 min antes de la inmersión de las secciones para mantener la saturación de  $\text{O}_2$ . Los hipocampos se diseccionaron rápidamente y se pegaron verticalmente sobre bloques de agar en la cámara. Se sumergieron en tampón de disección oxigenado y se hicieron secciones de 200  $\mu$ m utilizando un vibratomo TS1000 (Leica). Los parámetros de corte fueron 0.5 mm/s, 60 Hz y amplitud de 0.8 mm. Inmediatamente, las secciones fueron transferidas a un vial con tampón de disección sin sacarosa y burbujeadas la con mezcla gaseosa 95 %  $\text{O}_2$ /5 %  $\text{CO}_2$  a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, las secciones fueron incubadas con la sonda 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (100  $\mu$ M) (Invitrogen) durante 45 min en tampón Krebs (120 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 26 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.19 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.18 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 11 mM glucosa). Las secciones fueron lavadas dos veces con tampón Krebs y guardadas durante 15 min antes de comenzar el experimento. Entonces, las secciones fueron tratadas con kainato (500  $\mu$ M, 2 h) (Sigma),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 mM, 1 h) o tampón Krebs. Durante los últimos 5 min de incubación, las secciones fueron tratadas con ioduro de propidio (IP, 1 mg/ml) y con Hoechst 33342 (1 mg/ml).

La medición de la fluorescencia fue realizada en un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Eclipse TE300). La  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  fue excitada a 485 nm. La luz emitida fue

transmitida a través de un espejo dicróico de 505 nm y de un filtro de emisión de 520 nm. El IP fue excitado a 530 nm. La luz emitida fue transmitida a través de un espejo dicróico de 575 nm y de un filtro de emisión de 580 nm. El Hoechst fue excitado a 340 nm. La luz emitida fue transmitida a través de un espejo dicróico de 400 nm y de un filtro de emisión de 460 nm. La fluorescencia de IP se normalizó con la correspondiente al Hoechst.

### 20 Cuantificación de imágenes y análisis estadístico.

Las diferentes intensidades de las bandas (unidades densitométricas arbitrarias) correspondientes a la detección de proteínas por inmunoblot, fueron cuantificadas utilizando el programa MCID (MCID, Cambridge, UK).

La cuantificación densitométrica de la fluorescencia emitida por la H<sub>2</sub>DCFDA y por el IP en las secciones de hipocampo fue realizada con el programa Metafluor Analyst (MDS Analytical Technologies Downingtown, PA)

El análisis paramétrico cuantitativo de los datos experimentales y su significación estadística se realizó sometiendo la medida control y la medida problema a una prueba de *t* de *Student* empleando el programa de análisis estadístico Graph Pad Prism 5.0. Salvo que se indique lo contrario, el tamaño natural es n=3, considerado significativo p<0.05. Las barras de error indican desviación estándar o error estándar de la media, indicado según el caso.



## ***RESULTADOS***



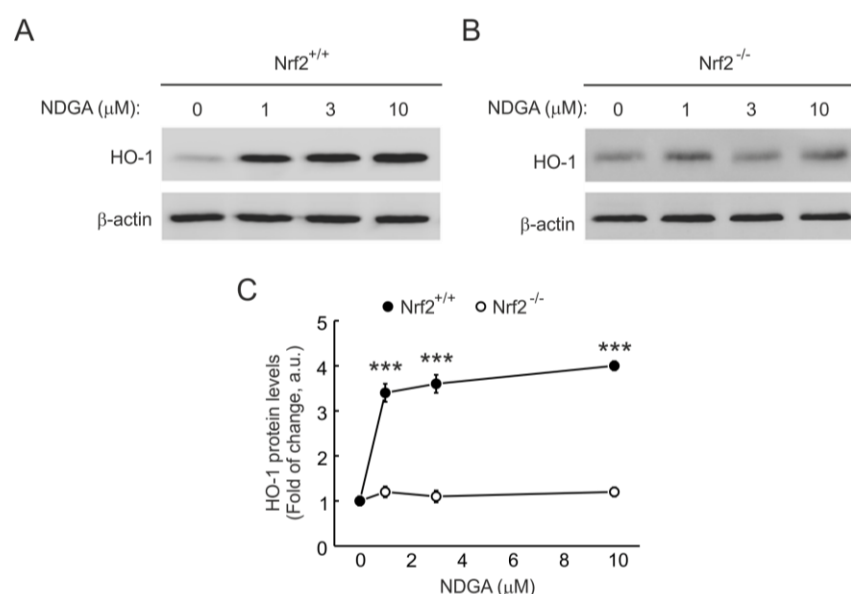
## Resultados

## 1 El ácido nordihidroguayarático (NDGA) activa a Nrf2 mediante la inhibición de la quinasa GSK-3.

### 1.1 El NDGA activa el eje Nrf2/HO-1 por un mecanismo independiente de Keap1.

En primer lugar, nos propusimos determinar si el NDGA activa la expresión de un gen prototipo con Elementos de Respuesta Antioxidantes (ARE) regulado por Nrf2, *Hmox1*, que codifica hemo oxigenasa-1 (HO-1) y si esta inducción es dependiente de Nrf2. Fibroblastos embrionarios (MEFs) de ratones silvestres (Nrf2<sup>+/+</sup>) o deficientes en Nrf2 (Nrf2<sup>-/-</sup>) fueron incubados con dosis crecientes de NDGA (1, 3 y 10  $\mu$ M, 6 h). Como se observa en la Fig. 11, el NDGA aumentó los niveles de proteína HO-1 únicamente en los MEFs silvestres, concluyendo que Nrf2 es imprescindible para la inducción de HO-1 mediada por el NDGA.

Múltiples estudios demuestran que los agentes electrofílicos activan a Nrf2 mediante la formación de aductos e inhibición de la E3 ligasa Keap1. Por tanto, analizamos si el NDGA podría participar en la regulación de Nrf2 mediante esta vía canónica. Para ello, utilizamos MEFs procedentes de ratones silvestres (Keap1<sup>+/+</sup>) o deficientes en Keap1 (Keap1<sup>-/-</sup>) tratados con NDGA durante los tiempos indicados (Fig. 12). Sorprendentemente, en ambos tipos celulares, el NDGA tuvo un efecto bifásico similar



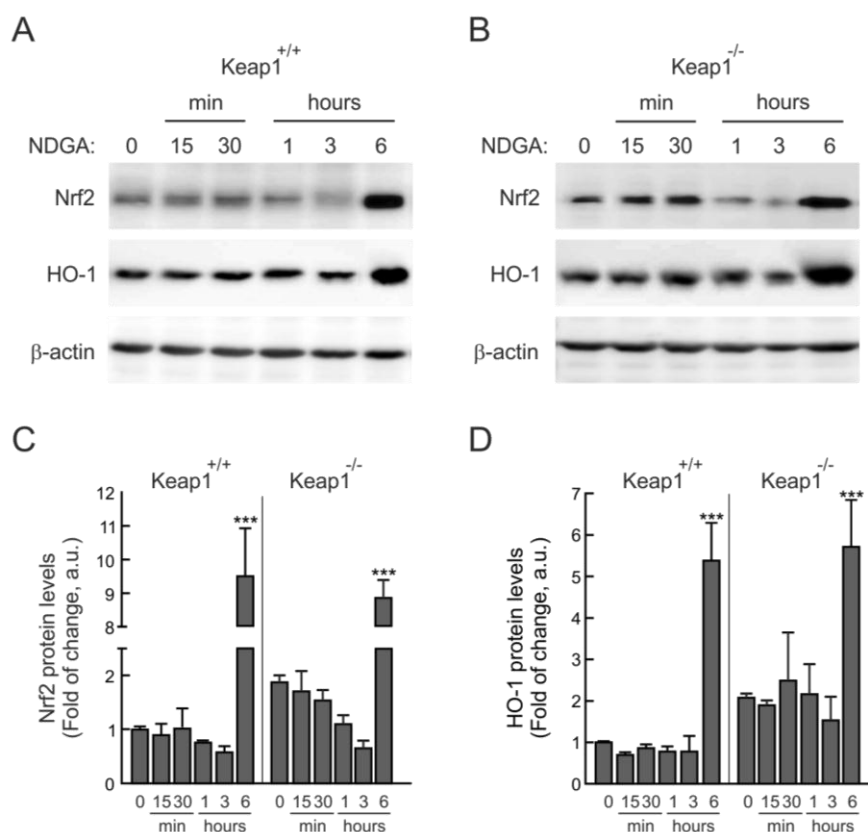
**Figure 11. NDGA requires Nrf2 to induce HO-1 protein expression.** *A* and *B*, HO-1 protein levels in MEFs from Nrf2<sup>+/+</sup> and Nrf2<sup>-/-</sup> mice subjected to the indicated NDGA concentrations for 6 h. (Top) Immunoblots with anti-HO-1 antibodies. (Bottom) Immunoblots with anti- $\beta$ -actin antibodies, showing similar amounts of protein lysate per lane. *C*, Densitometric quantification of *A* and *B*. Data are expressed as means  $\pm$  SEM, n=3. \*\*\*p<0.001 vs 0  $\mu$ M NDGA.

## RESULTADOS

sobre la acumulación de Nrf2, de manera que durante las 3 h iniciales, los niveles de Nrf2 disminuyeron, y durante las 3 h siguientes, la cantidad de Nrf2 aumentó alcanzando el máximo a las 6 h de tratamiento. También se observó un incremento similar en los niveles de HO-1 en ambas células a las 6 h de tratamiento. Estos resultados indican que el NDGA, un agente electrofílico estándar, utiliza un nuevo mecanismo de regulación de Nrf2 que es, al menos en parte, independiente de Keap1

### 1.2 Vías de señalización activadas por NDGA.

Puesto que existe un mecanismo alternativo a Keap1, analizamos si la activación de vías de señalización explicaría este comportamiento bifásico observado en la Fig. 12 a corto y largo plazo. Con el fin de examinar las posibles rutas que podrían ser inducidas por el NDGA, se analizó la activación de las quinasas Akt, ERK1/2, p38, y JNK en MEFs Keap1<sup>+/+</sup> y Keap1<sup>-/-</sup>. Para caracterizar el estado de activación de estas rutas, se utilizaron anticuerpos fosfoespecíficos que reconocen el estado activo de las quinasas correspondientes. Como se observa en la Fig. 13, el tratamiento con NDGA provocó de nuevo una respuesta bifásica. Durante la primera hora, observamos una reducción en la



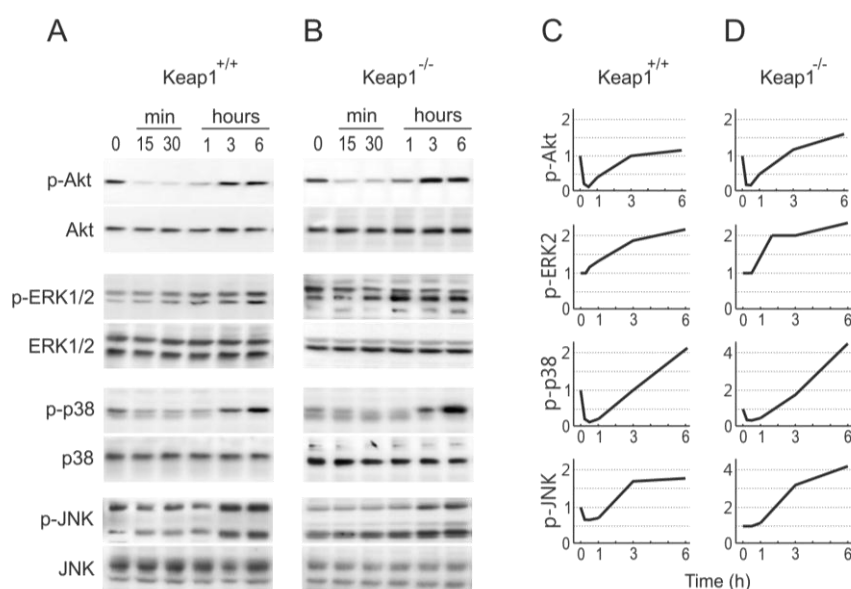
**Figure 12. NDGA increases Nrf2 and HO-1 protein levels in MEFs from Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> mice with similar kinetics.** Low-serum-starved MEFs were subjected to 15  $\mu$ M NDGA for the indicated times. **A** and **B**, Immunoblots, (top) anti-Nrf2 antibodies, (middle) anti-HO-1 antibodies, and (bottom) anti- $\beta$ -actin antibodies showing similar protein loads per lane. **C** and **D**, Densitometric analysis of Nrf2 and HO-1 protein levels from representative blots from **A** and **B**, expressed as a ratio of Nrf2/ $\beta$ -actin or HO-1/ $\beta$ -actin. Data are expressed as means  $\pm$  SEM, n=3. \*\*\*p<0.001 vs 0 time.



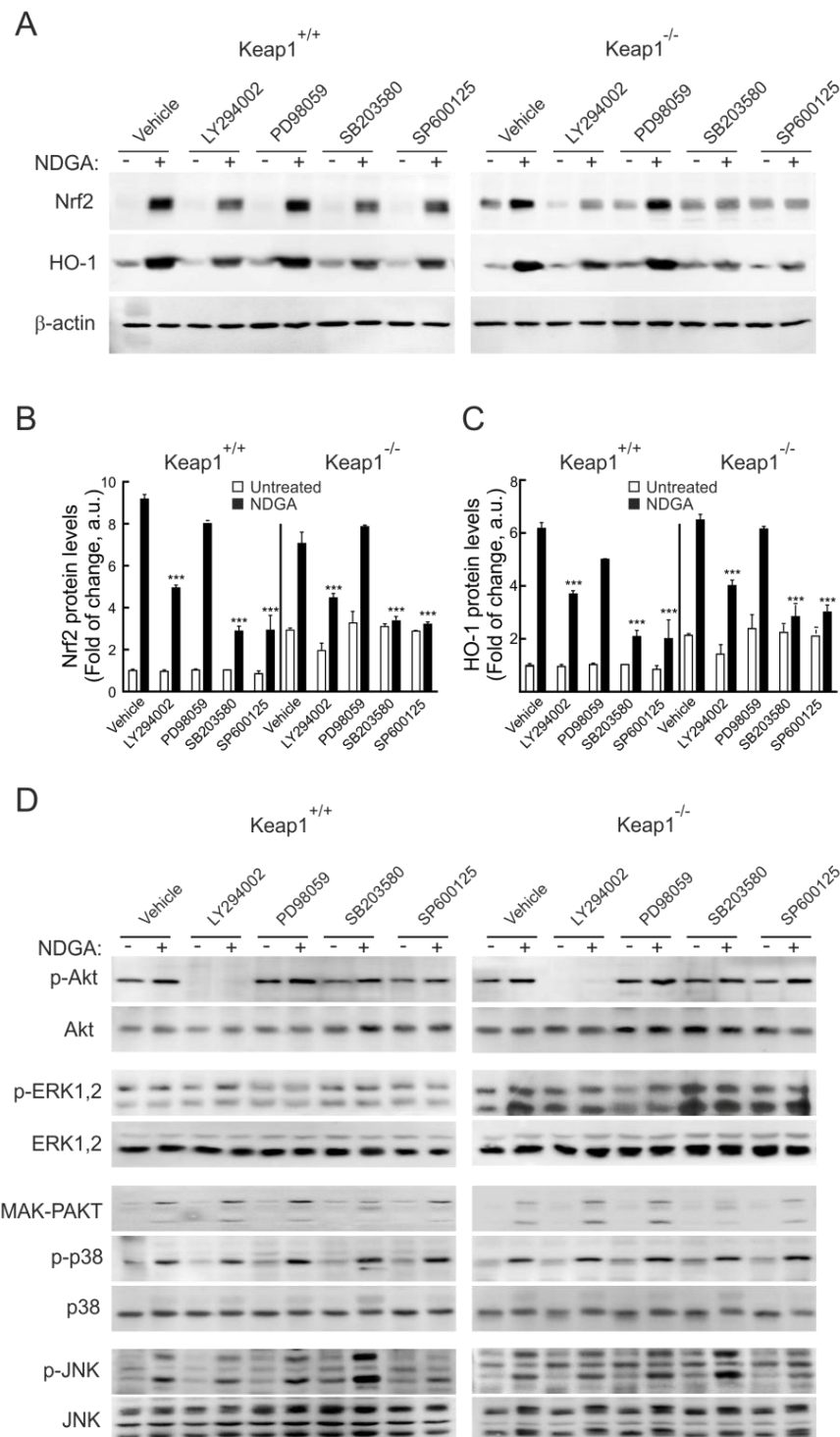
actividad de Akt y p38 en ambos tipos celulares, no teniendo efecto en la actividad de ERK1/2 y de JNK. Sin embargo, tras 3 y 6 h, las cuatro vías de señalización estaban activadas. Para determinar la contribución de estas rutas en el incremento de Nrf2, los MEFs Keap1<sup>+/+</sup> y Keap1<sup>-/-</sup> fueron pre-tratados con los inhibidores selectivos de cada vía durante 15 min y después con NDGA durante 6 h (Fig. 14). Como se observa en las Figs. 14A-C, la inhibición de las rutas PI3K/Akt, p38 y JNK pero no la de ERK1/2, supuso una reducción parcial de los niveles de Nrf2 por NDGA en ambos tipos celulares aunque el efecto fue más evidente en los MEFs Keap1<sup>-/-</sup>, posiblemente porque éstos ya carecen de la regulación dependiente de Keap1. Como control de inhibición, la Fig. 14D muestra la pérdida de fosforilación selectiva de cada quinasa con su inhibidor correspondiente. Estos resultados sugieren que este nuevo mecanismo de regulación de Nrf2, independiente de Keap1, involucra al menos tres rutas de señalización celular: PI3K/Akt, p38 y JNK.

### 1.3 Las vías de señalización activadas por NDGA convergen a nivel de la inhibición de GSK-3.

Aunque hay muchos estudios que demuestran el efecto de múltiples compuestos xenobióticos sobre la activación de estas vías de señalización, todavía no se conoce el mecanismo por el cual todas ellas convergen en la modulación de Nrf2. Un posible mecanismo de integración es la quinasa GSK-3, dado que como se ha descrito en la

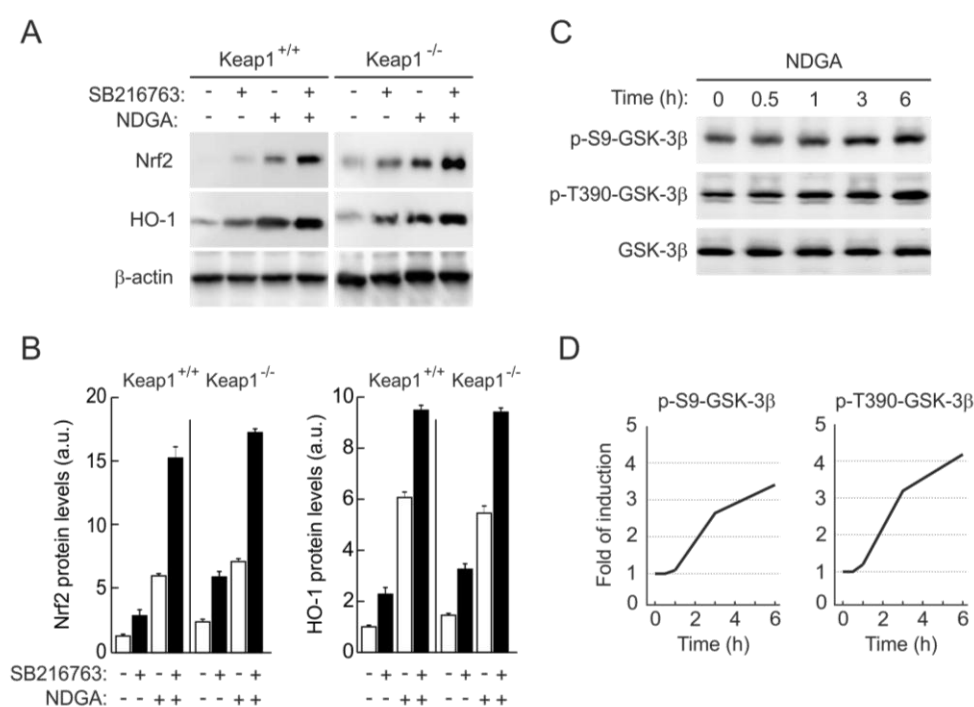


**Figure 13. NDGA activates the MAPK and PI3K pathways.** MEFs from Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> mice were maintained for 16 h in low-serum medium and then stimulated with 15  $\mu$ M NDGA for the indicated times. **A** and **B**, Whole-protein lysates were then immunoblotted with activation-specific antibodies that recognize phospho-Akt (p-Akt), phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2), phospho-p38 (p-p38), and phospho-JNK (p-JNK). Parallel immunoblots were analyzed for total kinase levels with anti-Akt, anti-ERK1/2, anti-p38, and anti-JNK antibodies, respectively. **C** and **D**, Graphs corresponding to densitometric quantification of phospho-Akt, phospho-ERK1/2, phospho-JNK, and phospho-p38 levels relative to total kinase levels as indicated.



**Figure 14. Effects of MAPK and PI3K inhibitors on induction of Nrf2 and HO-1 protein by NDGA.** MEFs from Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> mice were grown in low-serum medium for 16 h and then were pre-incubated with 40  $\mu$ M LY294002, 50  $\mu$ M PD98059, 5  $\mu$ M SB203580, or 10  $\mu$ M SP600125 for 15 min. Cells were subjected to 15  $\mu$ M NDGA for 6 h. **A**, (Top) Immunoblot with anti-Nrf2 antibodies, (middle) immunoblot with anti-HO-1 antibodies, (bottom) immunoblot with anti- $\beta$ -actin antibodies showing similar amounts of protein per lane. **B**, Densitometric quantification of Nrf2 protein levels from representative blots from **A** expressed as a ratio of Nrf2/ $\beta$ -actin. Data are expressed as means  $\pm$  SEM, n=3. \*\*\*p<0.001 vs NDGA control group. **C**, Densitometric quantification of HO-1 protein levels from representative blots from **A** expressed as a ratio of HO-1/ $\beta$ -actin. Data are expressed as means  $\pm$  SEM, n=3. \*\*\*p<0.001 vs NDGA control group. **D**, Inhibitory activity was monitored with phosphorylation specific antibodies that recognize the active forms of Akt (p-Akt1), ERK1/2 (p-ERK1/2), p38 (p-p38) and JNK (p-JNK). Inhibition of p38 activity was also monitored with anti-MAK-PAKT, which recognizes this phosphorylated product of p38 activity.

Introducción, puede ser inhibida tanto por PI3K/Akt a través de la fosforilación de la Ser21/9 de GSK-3 $\alpha/\beta$ , como por p38 y posiblemente JNK a través de la fosforilación en la Thr390 de GSK-3 $\beta$ . Con esta idea, se analizó la implicación de GSK-3 en la estabilidad de Nrf2 mediada por NDGA. Para ello, los MEFs Keap1<sup>+/+</sup> y Keap1<sup>-/-</sup> fueron tratados con NDGA (15  $\mu$ M) junto al inhibidor de GSK-3, SB216763 (20  $\mu$ M) durante 6 h (Figs. 15A y B). El SB216763 es un inhibidor competitivo de ATP selectivo que inhibe ambas isoformas de GSK-3 (IC<sub>50</sub> de 34 nM y 7 nM para GSK-3 $\alpha$  y GSK-3 $\beta$ , respectivamente). Tanto en los fibroblastos silvestres como en los deficientes en Keap1, el tratamiento combinado de NDGA y SB216763 provocó un incremento de los niveles de Nrf2 y HO-1, sugiriendo un efecto sinérgico de ambos compuestos. Dado que la inhibición de la actividad de GSK-3 $\beta$  puede ser monitorizada con anticuerpos contra las versiones fosforiladas en Ser9 y Thr390 de GSK-3 $\beta$  humana, analizamos las células humanas HEK293T. Como se muestra en las Figs. 15C y D, el tratamiento con NDGA durante 1 a 3 h incrementó las fosforilaciones inhibitorias de GSK-3 $\beta$  de la Ser9 y de la Thr390, situando a GSK-3 $\beta$  como



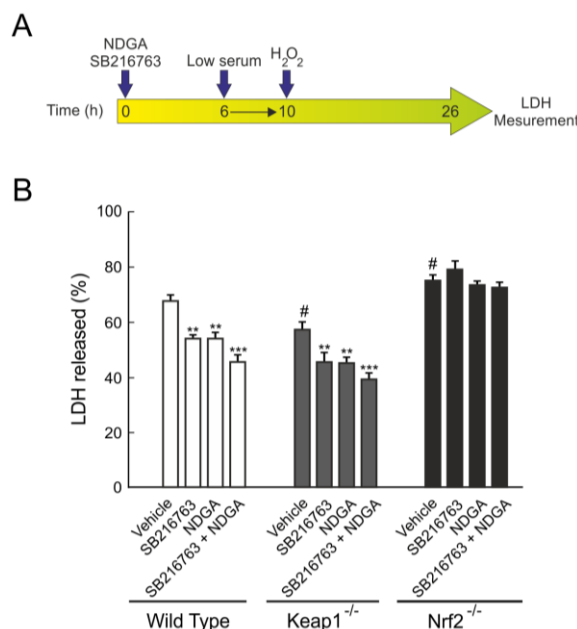
**Figure 15. NDGA targets GSK-3 and increases stability of Nrf2 through the Neh6 phosphodegron.** **A**, NDGA and the GSK-3 inhibitor SB216763 cooperate to increase Nrf2 and HO-1 protein levels in both Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> MEFs. Cells were grown in low serum for 16 h and then incubated with SB216763 or NDGA as indicated for 6 h, and whole-protein lysates were immunoblotted. (Top) Anti-Nrf2 antibodies, (middle) anti-HO-1 antibodies, (bottom) anti- $\beta$ -actin antibodies. **B**, Densitometric quantification of Nrf2 and HO-1 protein levels from representative blots from **A** expressed as a ratio of Nrf2/ $\beta$ -actin and HO-1/ $\beta$ -actin. Data are expressed as means  $\pm$  SEM, n=3. All groups p<0.001 vs NDGA control group. **C**, Time course of NDGA-induced phosphorylation of GSK-3 $\beta$ . HEK293T cells were grown in low-serum medium for 16 h and then were incubated with 15  $\mu$ M NDGA for the indicated times. GSK-3 $\beta$  activity was monitored with antibodies against phospho-Ser9 (p-S9) and phospho-Thr390 (p-T390), which recognize phosphorylated inactive forms of this kinase. **D**, Densitometric quantification of p-Ser9-GSK-3 $\beta$  and p-Thr390-GSK-3 $\beta$  from representative blots from **C** expressed as a ratio of p-Ser9-GSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$  and p-Thr390-GSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$ .

## RESULTADOS

un integrador de estas vías de señalización activadas por NDGA.

### 1.4 La inhibición de GSK-3 participa en la protección por NDGA frente a muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Con el fin de examinar la relevancia de la activación de Nrf2 por NDGA y el papel regulador de GSK-3, sometimos MEFs procedentes de ratones silvestres, Nrf2<sup>-/-</sup> y Keap1<sup>-/-</sup> al daño oxidativo producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos fibroblastos fueron tratados con SB216763 (10 µM) y NDGA (10 µM) durante 6 h, tiempo que permite inducir enzimas antioxidantes reguladas por Nrf2 (Fig. 11). Experimentos previos muestran que este tipo de compuestos promueven una pérdida transitoria de GSH. Por ello, decidimos dejar un tiempo de recuperación de 4 h antes de someterlas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 16 h (Fig. 16A). Analizamos la muerte celular a través de la liberación de lactato deshidrogenasa al medio extracelular (Fig. 16B). Las células Keap1<sup>-/-</sup> fueron más resistentes a la muerte inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las silvestres, posiblemente porque sus niveles de Nrf2 son más elevados en condiciones basales (Fig. 12). Tanto el NDGA como el SB216763 protegieron a los MEFs silvestres y Keap1<sup>-/-</sup> y además cooperaron en la citoprotección frente al daño causado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, en los MEFs Nrf2<sup>-/-</sup>, ni el NDGA ni el SB216763 mostraron un efecto citoprotector significativo. Estos resultados señalan la importancia funcional de la



**Figure 16. NDGA protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death by a Keap1-independent mechanism.** **A**, Experimental protocol of NDGA and SB216763 treatments to analyze the levels of LDH activity released. Low-serum-starved wild-type, Keap1<sup>-/-</sup>, and Nrf2<sup>-/-</sup> MEFs were treated with 10 µM SB216763, 10 µM NDGA, or both compounds for 6 h. Then, the cells were allowed to recover in low serum without these compounds for 4 h and finally were subjected to 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 16 h. **B**, LDH activity was measured in the culture medium and in cell lysates. Values correspond to percentage of LDH activity released into the culture medium and indicate means ± SEM of three samples. #p<0.05 vs untreated wild-type cells, and \*\*p<0.01 or \*\*\*p<0.001 vs each untreated cell type.

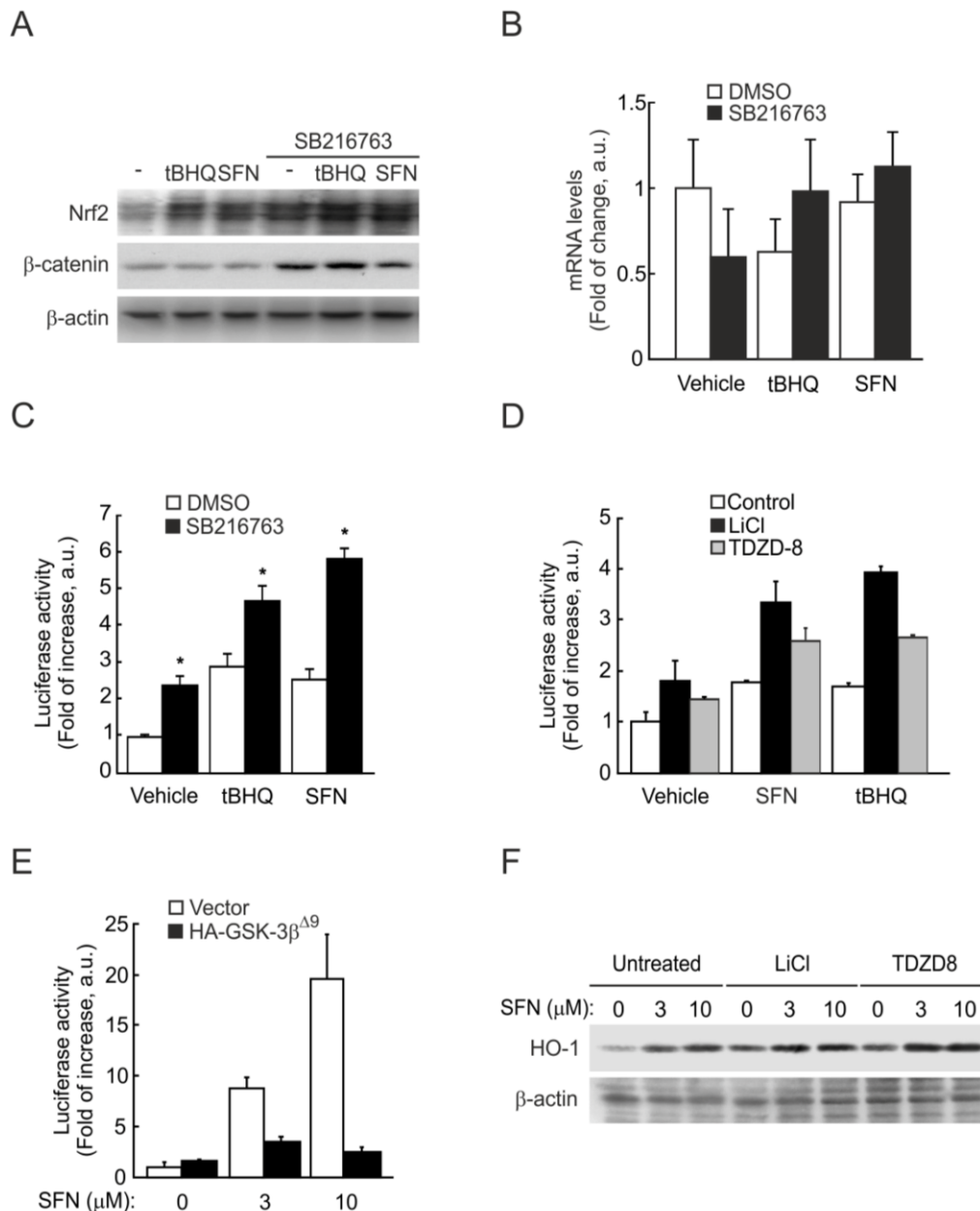
modulación del eje GSK-3/Nrf2 por el NDGA como mecanismo citoprotector frente a muerte celular inducida por estrés oxidativo.

### **1.5 Los inhibidores de GSK-3 cooperan con la tert-butilhidroquinona (tBHQ) y el sulforafano (SFN) en la inducción de Nrf2.**

A continuación determinamos si GSK-3 podría estar también implicada en la regulación de Nrf2 en respuesta a dos inductores modelo como la tert-butilhidroquinona (tBHQ) y el sulforafano (SFN). En primer lugar, medimos los niveles de Nrf2 en células HEK293T tratadas con estos dos inductores, tBHQ (15  $\mu$ M, 6 h) y SFN (10  $\mu$ M, 6 h), y con el inhibidor de GSK-3, SB216763 (20  $\mu$ M, 6 h). Como se muestra en la Fig. 17A, la tBHQ y el SFN produjeron un modesto incremento en los niveles proteicos de Nrf2. Por el contrario, no tuvieron efecto sobre los niveles de  $\beta$ -catenina, un sustrato bien caracterizado de GSK-3 que empleamos como control de la inhibición de esta quinasa. Es interesante que el tratamiento con SB216763 aumentó los niveles de  $\beta$ -catenina y Nrf2, y que este efecto fue más notorio en presencia de SFN o tBHQ. Como se observa en la Fig. 17B, los niveles de RNA mensajero de Nrf2 no sufrieron cambios significativos, indicando que las variaciones en los niveles proteicos de Nrf2 no fueron debidos a un cambio de expresión génica sino posiblemente a un aumento de la estabilidad de la proteína.

Con el objetivo de analizar el impacto del incremento de Nrf2 sobre su actividad transcripcional, utilizamos un plásmido reportero de luciferasa, denominado ARE-Luc. Este reportero está constituido por tres AREs procedentes del promotor del gen *Hmox1* dispuestos en tándem controlando la expresión del gen de la luciferasa. Las células HEK293T fueron transfectadas con el vector ARE-Luc y con pTK-Renilla, como control interno, y fueron tratadas durante 16 h con dosis sub-óptimas de tBHQ (3  $\mu$ M), SFN (3  $\mu$ M) y SB216763 (20  $\mu$ M) como se muestra en la Fig. 17C. Estas concentraciones fueron elegidas para obtener una inducción parcial que nos permitiera detectar la cooperación con SB216763. Los tratamientos con tBHQ, SFN o SB216763 supusieron una activación de 2,5-3,0 veces del reportero de luciferasa. Por otra parte, el tratamiento combinado de tBHQ o SFN con SB216763 condujo a un incremento aún mayor, de aproximadamente 5 veces, indicando un efecto cooperativo de ambos compuestos con el inhibidor de GSK-3.

En experimentos adicionales, estudiamos la regulación de Nrf2 por GSK-3 en células de neuroblastoma de ratón N2A utilizando dos inhibidores de GSK-3, litio y tiadiazolidinona-8 (TDZD-8), que no están relacionados estructuralmente con el SB216763. El litio es un inhibidor reversible no competitivo de ATP ( $IC_{50} = 2$  mM) y el



**Figure 17. GSK-3 modulates Nrf2 and HO-1 levels.** **A**, HEK293T cells were maintained in low-serum medium for 16 h before finally being treated with 15 μM tBHQ, or 10 μM SFN, or 20 μM SB216763 for 6 h. Upper blot, Nrf2 immunodetection in cell lysates; middle blot, β-catenin levels as a control for GSK-3 inhibition; lower blot, β-actin levels showing similar protein load per lane. **B**, Quantitative RT-PCR determination of messenger RNA of Nrf2 normalized by β-actin from HEK293T cells treated as in **A**. Variations are not statistically significant. **C**, HEK293T cells were transfected with ARE-LUC and pTK-Renilla control vectors, and after transfection the cells were treated with 3 μM tBHQ, or 3 μM SFN, or 20 μM SB216763 for 16 h before luciferase activity was measured. Asterisks denote statistically significant differences between the untreated and SB216763-treated groups according to a Student's t test. **D**, SFN induction of AREs is attenuated by HA-GSK-3β<sup>Δ9</sup> expression. N2A neuroblasts were transfected with ARE-LUC and pTK-Renilla control vector and either empty vector or HA-GSK-3β<sup>Δ9</sup> expression vector. After transfection cells were treated with the indicated SFN concentrations for 16 h and then analyzed for luciferase activity. **E**, Lithium and TDZD-8 enhance the activation of ARE-LUC by SFN and tBHQ. N2A neuroblasts were transfected with ARE-LUC and pTK-Renilla control vector, pre-incubated for 30 min with 10 mM LiCl or 30 μM TDZD-8 and then supplemented with 3 μM SFN or 2 μM tBHQ for 16 h. **F**, Lithium and TDZD-8 cooperate with SFN to elevate HO-1 protein levels. N2A neuroblasts were placed in low-serum medium and pretreated with or without 10 mM LiCl or 30 μM TDZD-8 and incubated with 3 μM SFN during 16 h. Upper panel, immunoblot showing HO-1 protein levels. Lower panel, immunoblot showing similar amount of β-actin levels per lane.



TDZD-8 es un inhibidor selectivo no competitivo de ATP que se une al sitio activo de GSK-3 ( $IC_{50} = 2 \mu M$ ). Las células transfectadas con los vectores ARE-Luc y pTK-Renilla fueron tratadas con LiCl (10 mM) o con TDZD-8 (30  $\mu M$ ) durante 30 min y después con los inductores de Nrf2, SFN (3  $\mu M$ ) o tBHQ (2  $\mu M$ ) durante 16 h. Como se muestra en la Fig. 17D, estos compuestos promovieron por sí solos un modesto incremento de la actividad luciferasa. Sin embargo, el litio o la TDZD-8 cooperaron con el SFN y con la tBHQ en la activación del reportero, alcanzando alrededor de 4 veces de inducción. Por otra parte, utilizamos un abordaje genético para regular la acción de GSK-3 sobre Nrf2, basado en la expresión de una versión constitutivamente activa de GSK-3 $\beta$  (HA-GSK-3 $\beta^{A9}$ ). Esta quinasa carece de los 9 primeros aminoácidos, perdiendo la serina 9, que participa en la inhibición de GSK-3 $\beta$  cuando es fosforilada por Akt u otras quinasas. Las células N2A se transfectaron con ARE-Luc, pTK-Renilla y HA-GSK-3 $\beta^{A9}$ . A continuación, las células fueron tratadas con SFN (3 y 10  $\mu M$ ) durante 16 h. Como se observa en la Fig. 17E, el SFN indujo la actividad transcripcional de Nrf2 sobre ARE-Luc de manera dosis dependiente. Sin embargo, la sobreexpresión de GSK-3 $\beta^{A9}$  bloqueó la inducción de Nrf2 por SFN. Asimismo, analizamos los niveles proteicos de HO-1 en respuesta a SFN y los inhibidores de GSK-3. Como se muestra en la Fig. 17F, el SFN indujo de manera dosis-dependiente un incremento en los niveles de HO-1. El litio o el TDZD-8 también provocaron por sí solos un leve incremento de HO-1. Sin embargo, el tratamiento combinado de estos inhibidores con SFN provocó un aumento mayor de los niveles de HO-1, alcanzando saturación a 3  $\mu M$  de SFN.

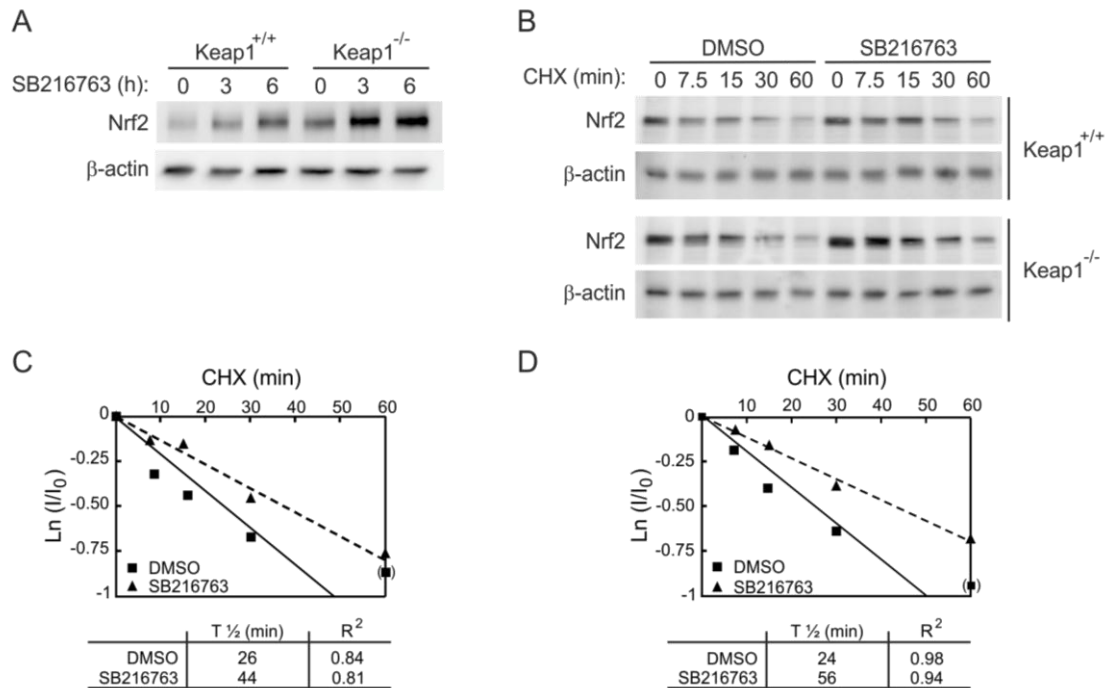
En conjunto, estos resultados indican que GSK-3 inhibe la acción de los inductores clásicos de Nrf2 y sugiere que la regulación farmacológica de este factor de transcripción es más eficiente en presencia de inhibidores de GSK-3.

## 2 Caracterización de la degradación de Nrf2 mediada por GSK-3/ $\beta$ -TrCP.

### 2.1 GSK-3 regula la estabilidad de Nrf2 por un mecanismo independiente de Keap1.

Dado que los resultados anteriores indican que GSK-3 modula la estabilidad de Nrf2, decidimos profundizar en este nuevo mecanismo de regulación y determinar con más detalle el papel de Keap1. Para ello, inhibimos GSK-3 en MEFs Keap1<sup>+/+</sup> y Keap1<sup>-/-</sup> con SB216763 (20  $\mu M$ , 3 o 6 h). La inhibición de GSK-3 incrementó los niveles de proteína de Nrf2 tanto en MEFs Keap1<sup>+/+</sup> como en los MEFs Keap1<sup>-/-</sup> (Fig. 18A). Como esperábamos, los MEFs deficientes en Keap1 presentaron niveles basales de Nrf2 elevados. Estos resultados sugieren que la acción de GSK-3 sobre Nrf2 es independiente de Keap1.

## RESULTADOS



**Figure 18. GSK-3 inhibition promotes Nrf2 protein accumulation in a Keap1-independent manner.** **A**, MEFs from Keap1-deficient (Keap1<sup>-/-</sup>) or wild-type littermates (Keap1<sup>+/+</sup>) were maintained in low-serum for 16 h and then treated with 20  $\mu$ M SB216763 for the times indicated. Upper blot, total Nrf2 protein levels; lower blot,  $\beta$ -actin levels showing that similar amounts of protein were loaded per lane. **B**, MEFs were maintained in low-serum for 16 h, and then treated with 20  $\mu$ M SB216763 for 2 h prior to inhibition of protein synthesis with 40  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX). Whole-cell lysates were prepared at the indicated times after addition of CHX. Upper blots, Nrf2 protein levels in Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> fibroblasts. Lower blots,  $\beta$ -actin levels showing similar protein loaded per lane from Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> fibroblasts. **C** and **D**, Both graphs depict the natural logarithm of the relative levels of Nrf2 protein as a function of CHX chase-time in Keap1<sup>+/+</sup> (**C**) or Keap1<sup>-/-</sup> (**D**) cells. Protein half-life has been determined in the linear range of the degradation curve.

Puesto que el principal mecanismo de regulación de Nrf2 consiste en el control de su estabilidad, nos propusimos analizar su vida media en respuesta a la inhibición de GSK-3 mediante un experimento de pulso y caza. MEFs silvestres y deficientes en Keap1 fueron pre-tratados con SB216763 (20  $\mu$ M, 2 h) y después con el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHX, 40  $\mu$ g/ml). Como se ilustra en la Fig. 18B, las células tratadas con SB216763 y CHX presentan un retraso en la curva de degradación de Nrf2 en comparación con las células tratadas sólo con CHX, incrementando su vida media desde 26 a 44 min en los MEFs Keap1<sup>+/+</sup> y desde 24 a 56 min en los MEFs Keap1<sup>-/-</sup> (Figs. 18C y D). En conjunto, estos resultados indican que GSK-3 modula la vida media de Nrf2 a través de un mecanismo independiente de Keap1.

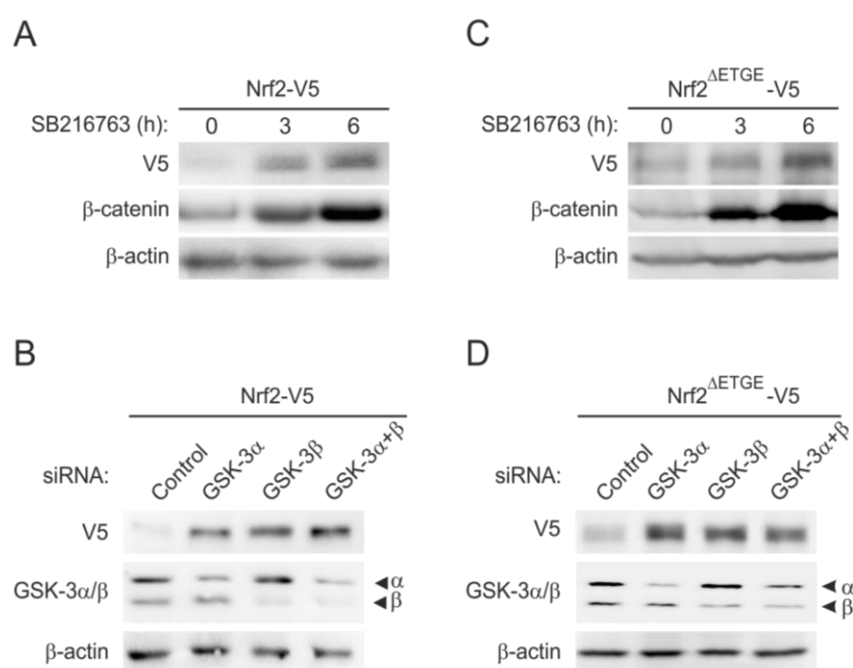
Como abordaje alternativo, comparamos los niveles proteicos de Nrf2 silvestre (Nrf2-V5) o una versión insensible a Keap1, que carece de los aminoácidos <sup>79</sup>ETGE<sup>82</sup> situados en el dominio de interacción con Keap1 (Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5) en presencia de SB216763. Como se muestra en las Figs. 19A y C, el tratamiento de células HEK293T con



SB216763 produjo una acumulación gradual de  $\beta$ -catenina, utilizada como control de inhibición de GSK-3, así como de ambas versiones de Nrf2, indicando de nuevo que GSK-3 actúa sobre Nrf2 independientemente de la regulación por Keap1.

Puesto que los inhibidores que hemos utilizado no discriminan entre las dos isoformas de GSK-3, empleamos un abordaje genético para silenciar la expresión de cada una de ellas mediante el uso de RNA de interferencia (siRNA). Las células HEK293T fueron transfectadas con vectores de expresión para Nrf2-V5 o Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 y 24 h después fueron transfectadas con los siRNAs contra GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$  o ambas isoformas. Como se aprecia en las Figs. 19B y D, obtuvimos una depleción de los niveles de estas isoenzimas en torno al 75% que correlacionó con un incremento sustancial en los niveles proteicos tanto de Nrf2-V5 como de Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5.

En conjunto, estos resultados indican que la inhibición farmacológica o genética de ambas isoenzimas produce un aumento en la estabilidad de Nrf2 de un modo independiente a Keap1.



**Figure 19. Modulation of Nrf2 protein levels by GSK-3 is independent of Keap1.** **A and C.** HEK293T cells were transfected with either V5-tagged Nrf2, wild-type, or Keap1-insensitive Nrf2 version (Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5), maintained in low-serum for 16 h and then treated with 20  $\mu$ M SB216763 for the indicated times. Upper blots, Nrf2-V5 (**A**) and Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 (**C**) protein levels; middle blots,  $\beta$ -catenin levels in the same cell lysates as a control for GSK-3 inhibition; lower blots,  $\beta$ -actin levels showing similar protein load per lane. **B and D.** HEK293T cells were transfected with either Nrf2-V5 (**B**) or Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 (**D**). After 24 h they were further transfected with siRNAs for GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , or both or with a control scrambled siRNA as explained in Materials and Methods. Cells were lysed 24 h after siRNA transfection. Upper blots, Nrf2-V5 (**B**) and Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 (**D**) protein levels; middle blots, GSK-3 $\alpha$  and  $\beta$  protein levels; lower blots,  $\beta$ -actin levels showing similar protein load per lane.

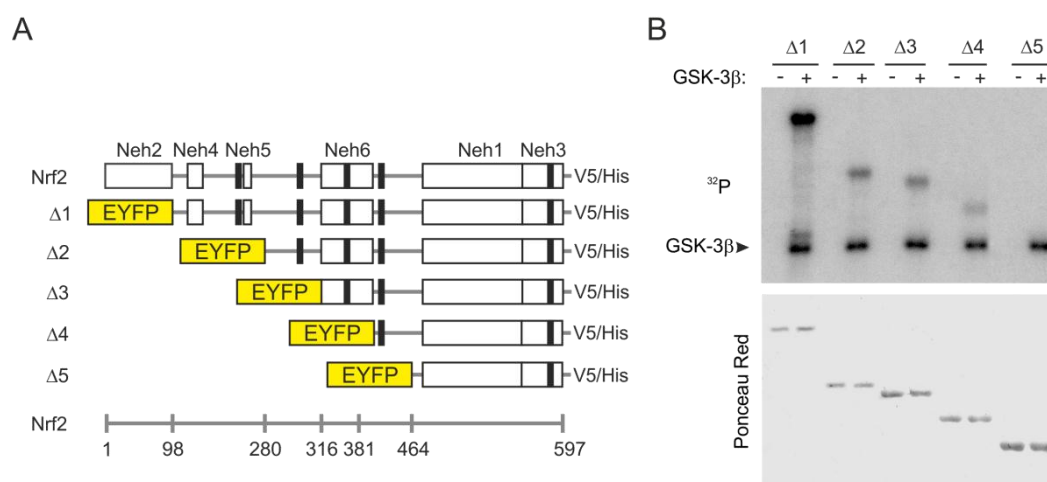
## RESULTADOS

Homo sapiens	1	MMDLELPPPGGLPSQQQMDLIDILWRQDIDLGV	SREVDFD	SRRKEYELEKQKKLEK
Mus musculus	1	MMDLELPPPGGLPSQQQMDLIDILWRQDIDLGV	SREVDFD	SRRQKDYELEKQKKLEK
Rattus norvegicus	1	MMDLELPPPGGLPSQQQMDLIDILWRQDIDLGV	SREVDFD	SRRQKDYELEKQKKLEK
Bos taurus	1	MMDLELPPPGGLPSQQQMDLIDILWRQDIDLGV	SREVDFD	SRRQKEHELEKQKKLEK
Gallus gallus	17	-----MNLIDILWRQDIDLGARREVDFD	SRRQKEYELEKQKKLEK	
Xenopus tropicalis	1	MMEIEMPLP-LQSQQQMDLIDILWKQDIDLGV	SREVFDYNQRQKENELEKQKKLEK	
Danio rerio	1	MMEIEMSKMQ-PSQQQMDLIDILWRQDIDLGV	SREVFDYNQRQKENELEKQKKLEK	
Homo sapiens	57	ERQEQLQKEQEKAFFFTQLQLDDEE	TGEFLP-IQPAQHTQSE	TSG-S-ANYSQV-AHIP
Mus musculus	57	ERQEQLQKEQEKAFFAQFLDDEE	TGEFLP-IQPAQHIQTD	TSG-S-ASYSQV-AHIP
Rattus norvegicus	57	ERQEQLQKEQEKAFFAQFLDDEE	TGEFLP-IQPAQHIQTD	TSG-S-VSYSQV-AHIP
Bos taurus	57	ERQEQLQKEQEKAFFAQFLDDEE	TGEFLP-IQPAQHIPSE	TSG-S-ANYSQV-APIP
Gallus gallus	57	ERQEQLQKEREKALLAQLVLDEE	TGEFVP-AQPAQRVQSE	NAEPPISFSQS-TDTS
Xenopus tropicalis	56	ERQEQLQKEREKALYAQLQLDDEE	TGEFIP-IQQA--APIE	TAAVTQELASSIEVKP
Danio rerio	56	QELQERLQEQEKTLLAQLQLDDEE	TGEFLPRSTPLTH	TPEADGGGAGEITQNGAFAE
Homo sapiens	110	K-SDALYFDDCMQLLAQ	TFFPVDDNEVSSATFQ	S
Mus musculus	110	K-QDALYFDDCMQLLAQ	TFFPVDDHE-----	S
Rattus norvegicus	110	K-QDALYFDDCMQLLAQ	TFFPVDDHE-----	S
Bos taurus	110	K-ADDLYFDDCMQLLAQ	TFFPVDDNEVSSATFQ	S
Gallus gallus	111	KPEEALSFDCCMQLLAQ	TFFIDDNEASPAAFQ	S
Xenopus tropicalis	109	SLVHDLSEFELKILGETFQLGPANE	ESSLAYQTLEPSDPIETN	QT
Danio rerio	112	QEADPMSFDECMQLLAQ	TFFLTPFAE-----	S
Homo sapiens	165	PE	T	SVAQVAPVDLDGMQDDIEQVWEEL
Mus musculus	158	LN	SSL-EAAMTDLSSIEQDMEQVWQELF	S
Rattus norvegicus	158	LD	SSL-ETAMTDLSSIEQDMEQVWQELF	S
Bos taurus	165	PE	T	LIVQVATAVLDDMQ-DIEQVWEEL
Gallus gallus	165	PS	SLP-GIVPLTDAENMQ-NIEQVWEEL	S
Xenopus tropicalis	165	AG	T	---LSSIPAEGEIMHEMNQAWHEEL
Danio rerio	159	ADVP	---	AFTQNPLLPGLSDQAWMELL
Homo sapiens	219	KL	T	TEVD-NY-HFY
Mus musculus	211	TL	T	TEMDSNY-HFY
Rattus norvegicus	211	TL	T	TEMDSNY-HFY
Bos taurus	218	KL	T	TEID-NY-HFY
Gallus gallus	217	KPA	EMHNSY-DYNS	SLP
Xenopus tropicalis	217	TMT	ETPDY-SFLS	PLSTIEK
Danio rerio	209	APT	QNYSQLPGMDHLGS	SAQTEV--CPPEFTNTYNR
Homo sapiens	273	SDA	T	VNTD-FGDEFYS
Mus musculus	266	SNP	T	LNLT-FGDEFYS
Rattus norvegicus	266	SNP	T	LNLT-FGDEFYS
Bos taurus	272	SSA	T	VNTD-FGDEFYS
Gallus gallus	271	NSL	T	LS
Xenopus tropicalis	263	TNT	A	FNVESFCDDIFT
Danio rerio	262	VGA	E	FGPEEFNELFYPE--MEVKVNNP
Homo sapiens	328	FNQ	NHPES-TAE	FNDSD
Mus musculus	319	FNP	KHAEG-TME	FNDSD
Rattus norvegicus	319	FNQ	KHTEG-TVE	FNDSD
Bos taurus	327	FNQ	NHPES-TAE	FNDSD
Gallus gallus	325	FNDD	HS-GTV	PECNDS
Xenopus tropicalis	314	FNG	NNQ---	PEFNDSD
Danio rerio	315	FSS	GKDPD-IVE	FQDSD
Homo sapiens	382	DS	APGSVKQNGPKT-PVHS	SGDMVQPL
Mus musculus	373	DS	APGSVKQNGPKAQAHS	PGDTVQPL
Rattus norvegicus	373	DS	APGSVKQNGPKAQAHS	PGDTVQPL
Bos taurus	383	DS	T	PGNVKQKGP
Gallus gallus	379	DS	SPGSVPQGNASVYSSRF	PDQVL---
Xenopus tropicalis	365	DS	T	PETAQKQKPDNFTAFTEDTYFTL
Danio rerio	364	EGS	PGSMESDYNEIFPLVY	LNDGSQ--T
Homo sapiens	437	RK	TPFTKDKH	SSRLEAHL
Mus musculus	429	QK	APFTKDKH	SSRLEAHL
Rattus norvegicus	429	QK	APFTKDKH	SSRLEAHL
Bos taurus	439	RK	TPFTKDKH	SSRLEAHL
Gallus gallus	432	PK	APFTKDKH	SSRLEAHL
Xenopus tropicalis	421	SK	APFAKDKYLSR	QEARFT
Danio rerio	418	SK	PPFTKDKH	SSRLEAHL
Homo sapiens	493	AQL	ALIRDIRRRGKNKVA	AQNCRKRKLEN
Mus musculus	485	AQL	ALIRDIRRRGKNKVA	AQNCRKRKLEN
Rattus norvegicus	485	AQL	ALIRDIRRRGKNKVA	AQNCRKRKLEN
Bos taurus	495	AQL	ALIRDIRRRGKNKVA	AQNCRKRKLEN
Gallus gallus	488	AQL	ALIRDIRRRGKNKVA	AQNCRKRKLEN
Xenopus tropicalis	477	AQL	ALIRDIRRRGKNKVA	AQNCRKRKMDN
Danio rerio	474	AQL	ALVRDIRRRGKNKVA	AQNCRKRKLEN
Homo sapiens	549	SLH	LLKKQL	STLYLEVFS
Mus musculus	541	NLH	LLKKRL	STLYLEVFS
Rattus norvegicus	541	NLH	LLKKRL	STLYLEVFS
Bos taurus	551	SLH	LLKKQL	STLYLEVFS
Gallus gallus	544	SLR	QMKKQL	STLYLEVFS
Xenopus tropicalis	533	SLS	QLKKKL	GALYMEVFNKLQDENGQPY
Danio rerio	530	NLK	EMKQQL	STLYQEVFGMLRDENGKAF

**Figure 20 Previous page. Putative Ser and Thr phosphorylation sites in Nrf2 from vertebrates.** Boxes indicate residues that are conserved at least in mammals. Yellow squares and blue boxes indicate clusters of Ser/Thr residues that might be phosphorylated by GSK-3 with the collaboration of other kinases. These kinases, termed priming kinases, might create a recognition phospho-motive for GSK-3 in the consensus sequence (S/T)X<sub>(1-4)</sub>p(S/T), where X is any amino acid and p(S/T) is a Ser/Thr residue that has been previously phosphorylated by some priming kinases. Red boxes indicate Ser residues adjacent to Pro, that might be phosphorylated by GSK-3 without the collaboration of a priming kinase.

## 2.2 GSK-3 fosforila varias regiones de Nrf2.

Como se muestra en la Fig. 20, Nrf2 presenta 5 regiones ricas en serina que conforman el patrón consenso de fosforilación por GSK-3, (S/T)X<sub>(1-4)</sub>(pS/pT), donde los residuos de pS/pT son los fosforilados previamente, es decir primados, por otras quinasas. También se destacan seis serinas y treoninas adyacentes a prolina ya que GSK-3 podría fosforilar estos residuos sin necesidad de primado. Dado el alto número de secuencias candidatas, estudiamos la fosforilación mediada por GSK-3 en mutantes de Nrf2 con deleciones crecientes desde el extremo N-terminal fusionados a proteína fluorescente amarilla (Fig. 21A). Estas quimeras, expresadas en bacterias y purificadas gracias a su cola de histidinas, fueron utilizadas para un ensayo de quinasa *in vitro* con GSK-3 $\beta$  recombinante. Como se muestra en la Fig. 21B, GSK-3 $\beta$  fosforiló *in vitro* a Nrf2 en numerosos sitios, disminuyendo la fosforilación a medida que la deleción fue mayor. Concretamente, la disminución fue más acentuada cuando se eliminaron las regiones 98-279 (entre los mutantes  $\Delta 1$  y  $\Delta 2$ ) y 316-380 (entre los mutantes  $\Delta 3$  y  $\Delta 4$ ). Estos resultados indican que GSK-3 puede fosforilar a Nrf2 en varios sitios y por tanto no nos permiten identificar los residuos clave para regular su estabilidad.



**Figure 21. GSK-3 phosphorylates Nrf2 in multiple sites.** **A**, Diagram showing the general organization of the Neh domains in Nrf2 according to (96) and the EYFP-mNrf2-V5 chimeras with N-terminal deletions of mNrf2. Each chimera carries the following residues from mNrf2:  $\Delta 1$ , 98-579;  $\Delta 2$ , 280-579;  $\Delta 3$ , 316-579;  $\Delta 4$ , 381-579;  $\Delta 5$ , 464-579. Black boxes indicate the position of Ser/Thr clusters that might be phosphorylated by GSK-3. **B**, Representative *in vitro* kinase assay on recombinant EYFP-Nrf2 chimeras with recombinant GSK-3 $\beta$ . Upper panel, <sup>32</sup>P autoradiography showing EYFP-Nrf2 and GSK-3 phosphorylated forms; lower panel, Ponceau Red staining showing similar amounts of EYFP-Nrf2 chimeras per reaction.

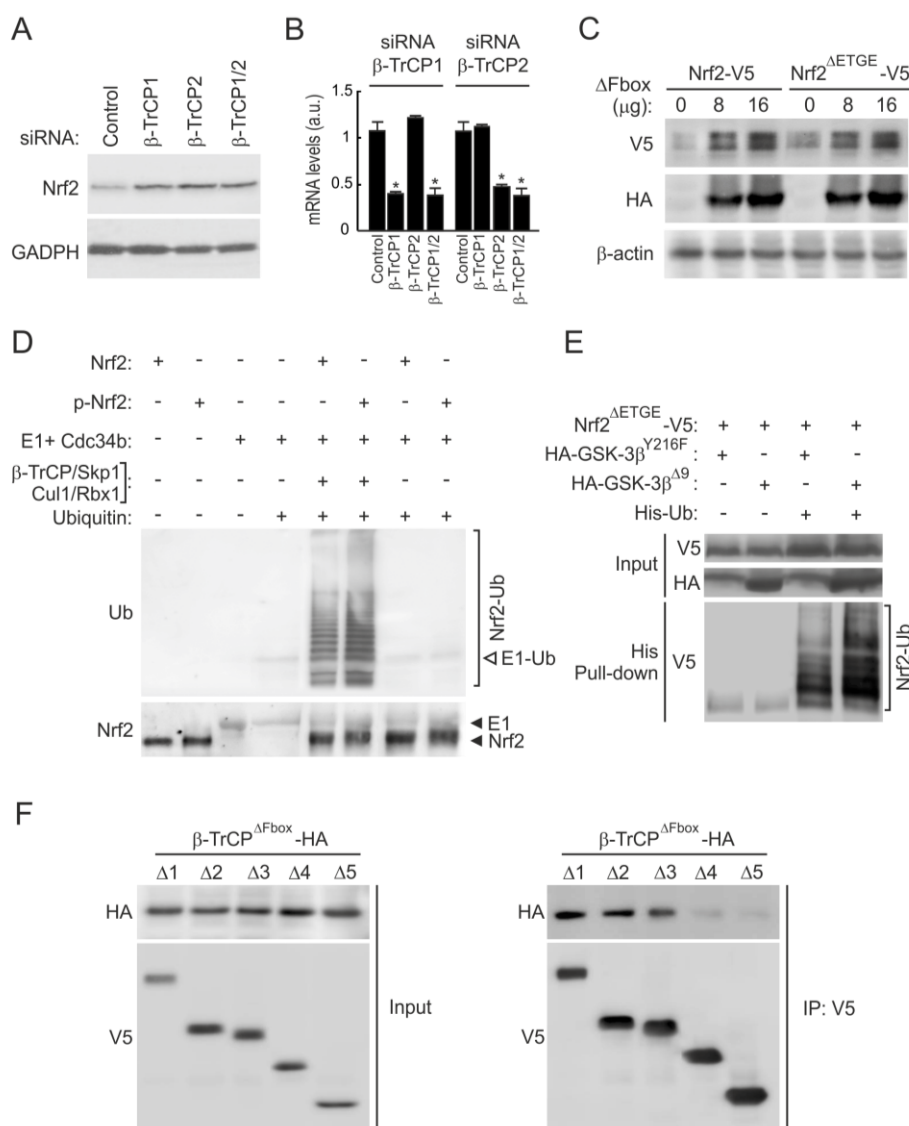
### 2.3 El sistema SCF/ $\beta$ -TrCP degrada Nrf2.

En la bibliografía se recoge que GSK-3 regula la estabilidad de algunos de sus sustratos a través de la E3 ligasa SCF/ $\beta$ -TrCP. Dado que GSK-3 actúa regulando la estabilidad de Nrf2, examinamos el papel del complejo SCF/ $\beta$ -TrCP en MEFs Keap1<sup>-/-</sup> para evitar la interferencia de esta otra E3 ligasa. Los MEFs se transfectaron con siRNAs contra las isoformas de  $\beta$ -TrCP. Como se observa en las Figs. 22A y B, el silenciamiento de  $\beta$ -TrCP1,  $\beta$ -TrCP2, o ambos supuso un incremento de los niveles proteicos de Nrf2. Estos resultados indican que ambas isoformas de  $\beta$ -TrCP están involucradas en la regulación de la estabilidad Nrf2 y apoyan la existencia de un dominio de degradación por  $\beta$ -TrCP en Nrf2. Dado que existe redundancia en la función de ambas isoformas de  $\beta$ -TrCP, en el resto de esta Tesis se indicará de forma general  $\beta$ -TrCP sin precisar la isoenzima utilizada.

Alternativamente, utilizamos una versión dominante negativa de  $\beta$ -TrCP,  $\beta$ -TrCP $\Delta$ Fbox-HA, que carece del dominio Fbox, responsable de la unión a Skp1, y por tanto, es incapaz de formar complejos de degradación funcionales. Las células HEK293T fueron transfectadas con Nrf2-V5 y Nrf2 $\Delta$ ETGE-V5 junto a cantidades crecientes de  $\beta$ -TrCP $\Delta$ Fbox-HA. En presencia de esta versión dominante negativa, se observó la acumulación de Nrf2-V5 y Nrf2 $\Delta$ ETGE-V5 (Fig. 22C), indicando nuevamente que  $\beta$ -TrCP participa en la degradación de Nrf2.

A continuación obtuvimos una primera evidencia de que Nrf2 es ubiquitinado por un mecanismo dependiente de  $\beta$ -TrCP mediante un ensayo conjugado de fosforilación y ubiquitinación *in vitro*. En primer lugar Nrf2 recombinante fue fosforilado *in vitro* por GSK-3 $\beta$  para crear un sustrato que pudiera ser reconocido por  $\beta$ -TrCP. Dicho sustrato fue sometido a un ensayo de ubiquitinación utilizando el complejo de proteínas recombinantes que conforman SCF/ $\beta$ -TrCP. Como se muestra en la Fig. 22D, Nrf2 fue poliubiquitinado sólo en presencia del complejo SCF/ $\beta$ -TrCP completo. Además, observamos que Nrf2 fosforilado incorporó aproximadamente 2 veces más ubiquitina que la versión no fosforilada. Estos resultados indican que Nrf2 es un sustrato del complejo SCF/ $\beta$ -TrCP.

El siguiente paso fue analizar *in vivo* la ubiquitinación de Nrf2. Para ello, células HEK293T fueron transfectadas con Nrf2 $\Delta$ ETGE-V5 y con un vector de expresión que codifica ubiquitina etiquetada con histidinas (His-Ub). Además, se incluyeron plásmidos que expresan GSK-3 $\beta$  inactiva, HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup>, o activa, HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>. La cantidad de Nrf2-V5 ubiquitinado con His-Ub fue analizada en un ensayo de “pull-down” de histidinas seguido



**Figure 22. Nrf2 is regulated by the E3 ligase  $\beta$ -TrCP through a Keap1-independent mechanism.** **A**, Keap1<sup>-/-</sup> MEFs were transfected with siRNA against  $\beta$ -TrCP1 or/and  $\beta$ -TrCP2. Upper blot, Nrf2 levels; lower blot, GADPH levels showing similar protein load per lane. **B**, Quantitative RT-PCR determination of mRNA for  $\beta$ -TrCP1 and  $\beta$ -TrCP2 normalized by  $\beta$ -actin from MEFs transfected as in **A**. Asterisks denote statistically significant differences with \*p<0.05. **C**, HEK293T cells were co-transfected with Nrf2-V5 or Nrf2 $\Delta$ ETGE-V5 and the indicated amounts of the  $\beta$ -TrCP dominant negative ( $\beta$ -TrCP $\Delta$ Fbox-HA) mutant and then maintained in low-serum for 16 h. Whole-cell lysates were immunoblotted against anti-V5 antibody (upper blot), anti-HA antibody (middle blot) or with anti- $\beta$ -actin antibody showing similar amount of protein per sample (lower blot). **D**, *In vitro* ubiquitination of Nrf2 by  $\beta$ -TrCP complex. Bacterially expressed His-tagged Nrf2 was submitted to *in vitro* kinase assay in the absence (Nrf2) or presence (phospho-Nrf2) of recombinant GSK-3 $\beta$ . Nrf2 and phospho-Nrf2 (20 ng) were incubated at 25 °C for 1 h with purified ubiquitin, E1/Cdc34b,  $\beta$ -TrCP/Skp1 and Cul1/Rbx1 as indicated. Upper blot, poly-ubiquitinated Nrf2 detected by immunoblotting with anti-ubiquitin antibody. Lower blot, anti-Nrf2 showing similar amount of substrate per lane. Black arrowheads point the position of Nrf2 and E1; white arrowhead points the position of monoubiquitinated E1. **E**, HEK293T cells transfected with the indicated plasmids were treated with MG132 (40  $\mu$ M) for 3 h. A whole-cell lysate (input) and an affinity-purified His-tagged fraction (His-pull-down) were blotted with anti-V5 antibody. Upper blot, anti-V5 input; middle blot, ectopically expressed HA-tagged GSK-3 $\beta$ ; lower blot, anti-V5 detection in His-pull-down fraction. The bracket indicates the mobility of poly-ubiquitinated Nrf2-V5 (Nrf2-Ub) forms. **F**, Pull down assays of HEK293T cells co-transfected with expression vectors for the indicated EYFP fusion proteins,  $\Delta$ 1,  $\Delta$ 2,  $\Delta$ 3,  $\Delta$ 4, and  $\Delta$ 5, and  $\beta$ -TrCP $\Delta$ Fbox. Left panels, immunoblots showing inputs of ectopically expressed  $\beta$ -TrCP $\Delta$ Fbox-HA and EYFP-mNrf2-V5 proteins with anti-HA and anti-V5 antibodies, respectively. Right panels, immunoprecipitation of EYFP-mNrf2-V5 fusion chimeras with anti-V5 antibody followed by immunoblot with either anti-HA antibody to detect  $\beta$ -TrCP $\Delta$ Fbox-HA, or with anti-V5 antibody to detect EYFP-mNrf2-V5 chimeras.



## RESULTADOS

de inmunoblot con anticuerpo anti-V5 (Fig. 22E). En presencia de HA-GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$ , se observó un incremento en la ubiquitinación de Nrf2 en comparación con el mismo ensayo utilizando la versión inactiva de la quinasa, HA-GSK-3 $\beta^{Y216F}$ . En conjunto, estos resultados indican que GSK-3 crea un sitio de reconocimiento en Nrf2 para ubiquitinación *in vivo* por la E3 ligasa SCF/ $\beta$ -TrCP.

Considerando que GSK-3 puede fosforilar a Nrf2 en varios residuos (Fig. 21), utilizamos un ensayo de asociación con los mutantes de delección EYFP-Nrf2 para mapear los sitios implicados en la interacción con  $\beta$ -TrCP. Las células HEK293T fueron co-transfectadas con los vectores de expresión de los mutantes de delección de Nrf2 junto a la versión dominante negativa de  $\beta$ -TrCP,  $\beta$ -TrCP $\Delta^{Fbox}$ -HA. Tras la transfección, las células fueron deprivadas de suero durante 16 h para mantener GSK-3 endógeno activo (180). La inmunoprecipitación de las quimeras de EYFP-Nrf2 con anticuerpo V5 demuestra que la asociación entre Nrf2 y  $\beta$ -TrCP se produce sólo en presencia de la región comprendida entre los aminoácidos 316 y 381 del dominio Neh6 de Nrf2 (proteínas  $\Delta 1$ ,  $\Delta 2$  y  $\Delta 3$ ) (Fig. 22F). Estos datos indican que Nrf2 presenta en el dominio Neh6 una secuencia putativa de fosforilación por GSK-3 y de degradación por  $\beta$ -TrCP.

### **2.4 GSK-3 $\beta$ participa en la fosforilación de un grupo de serinas de Nrf2 dentro del dominio de destrucción por $\beta$ -TrCP.**

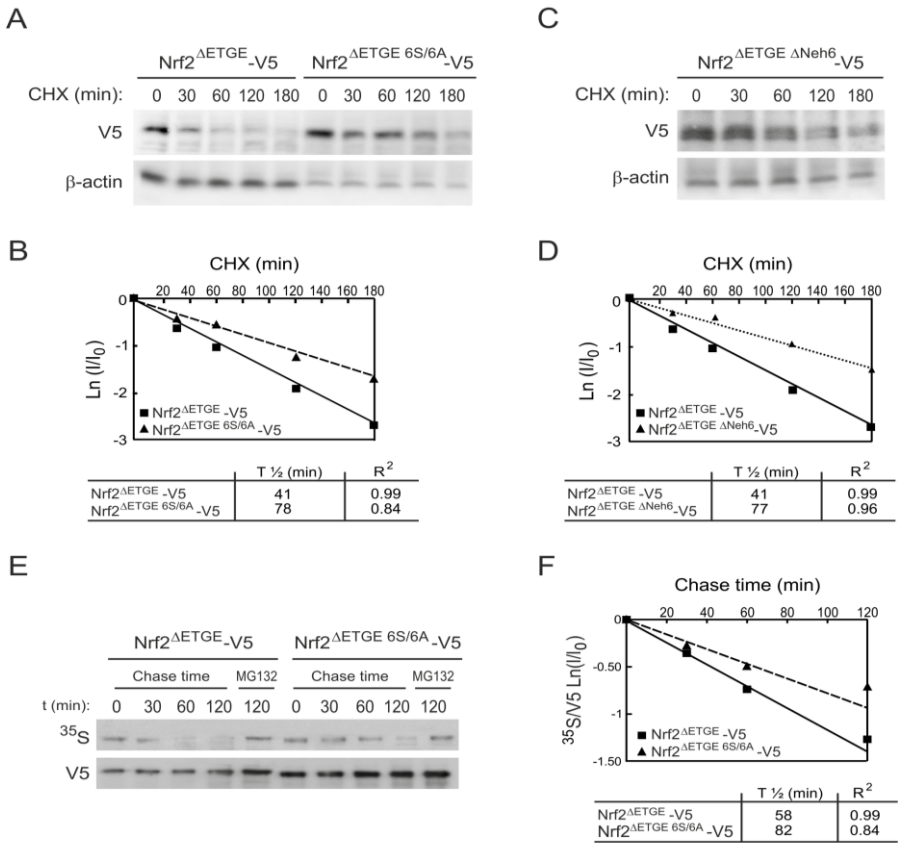
Algunas proteínas fosforiladas por GSK-3 como  $\beta$ -catenina o Snail, presentan un dominio de destrucción consenso para  $\beta$ -TrCP caracterizado por la secuencia K(X) $_n$ DSG(X) $_{1-4}$ S, donde X corresponde a cualquier aminoácido (Fig. 23A). La fosforilación por GSK-3 en estos dominios promueve la degradación de sus sustratos por el sistema SCF/ $\beta$ -TrCP. En el dominio Neh6, Nrf2 contiene una secuencia conservada evolutivamente que se asemeja al dominio de destrucción consenso para  $\beta$ -TrCP, y que, además, solapa con la secuencia rica en serinas que presenta un patrón consenso de fosforilación por GSK-3, (S/T)X $_{(1-4)}$ (pS/pT). Este grupo de serinas está localizado en ratón entre los aminoácidos 335 y 355 y en humano entre los residuos 344 y 364 (Fig. 23A). El motivo de degradación por  $\beta$ -TrCP está presente en todos los vertebrados excepto en pollo, que contiene el dominio DSG(X) $_{1-4}$ S, pero carece de la lisina N-terminal que presentan el resto de vertebrados. En este sentido la proteína de pollo es similar a Snail humano y YAP humano. Los sustratos con el motivo DSG(X) $_{1-4}$ S más parecido a Nrf2 son YAP y EpoR, ya que estas proteínas presentan sólo dos residuos, Gly-Leu o Gly-Ile, entre las dos serinas del motivo DSG(X) $_{1-4}$ S, mientras que en Nrf2 estos residuos son Gly-Ile.



## RESULTADOS

351 y 355 mutados a alaninas. Estas proteínas fueron utilizadas como sustratos en ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando diferentes versiones de GSK-3 $\beta$ , inactiva (HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup>) o activa (HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup> o HA-GSK-3 $\beta$ <sup>S9A</sup>) obtenidas por transfección de células HEK293T. Como se muestra en la Fig. 23B, la quinasa inactiva no fue capaz de fosforilar Nrf2, descartando así posibles quinasas contaminantes en los inmunocomplejos. Por el contrario, Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-HisB y Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A</sup>-HisB fueron fosforilados *in vitro* por los mutantes activos de GSK-3 $\beta$ . Sin embargo, la fosforilación de Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A</sup>-HisB fue considerablemente menor que la de Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-HisB, implicando que entre los sitios de fosforilación de Nrf2 por GSK-3 $\beta$  se encuentra este grupo de serinas localizado sobre el dominio de degradación por  $\beta$ -TrCP.

Para determinar si la fosforilación de este grupo de serinas en Nrf2 afecta a su



**Figure 24. Mutation of the 6S cluster within the Neh6 domain increases Nrf2 protein stability.** **A** and **C**. HEK293T cells were transfected with Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 or Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A</sup>-V5 or Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE  $\Delta$ Neh6</sup>-V5, low-serum starved for 16 h, and finally submitted to protein synthesis inhibition with 100  $\mu$ g/ml CHX. Whole-cell lysates were prepared at the indicated times after addition of CHX. Upper blot, Nrf2-V5 protein levels. Lower blot,  $\beta$ -actin levels showing similar protein load per lane. **B** and **D**. Graphs depict the natural logarithm of the relative levels of Nrf2-V5 protein as a function of CHX chase-time. Protein half-life was determined using the linear part of the degradation curve. **E**. HEK293T cells were transfected with Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 or Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A</sup>-V5, serum-starved for 16 h and then submitted to [<sup>35</sup>S]-methionine/[<sup>35</sup>S]-cysteine labelling for 1h. Then, cells were incubated in high methionine- and cysteine-containing medium and collected at the indicated times. For the 120 min-point the cells were treated with MG132 as internal control. Upper blot, <sup>35</sup>S-autoradiography; lower blot, anti-V5 antibody. **F**. The graph shows the natural logarithm of the relative levels of Nrf2 as a function of <sup>35</sup>S chase-time. Half-life has been determined in linear range of the degradation curve.

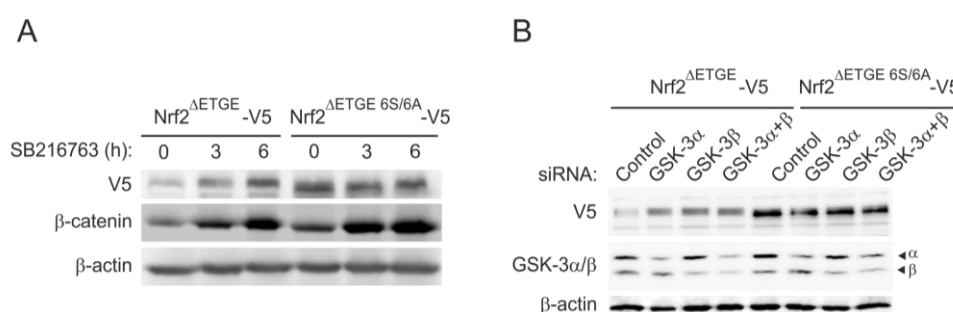


estabilidad, comparamos los niveles de Nrf2<sup>ΔETGE-V5</sup> y Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A-V5</sup> en condiciones basales. La mutación de este grupo de serinas a alaninas supuso un incremento de los niveles de Nrf2 ectópico, mientras que no observamos cambios significativos en los niveles de RNA mensajero (Figs. 23C-F). Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A-V5</sup> exhibió una movilidad electroforética más rápida en relación con la de Nrf2<sup>ΔETGE-V5</sup> (Fig. 23C). Esto es debido, por una parte, a la variación en la masa molecular (104 Da por las seis sustituciones Ser a Ala), y, por otra, a que esta versión está menos fosforilada que la silvestre.

A continuación, estudiamos cómo influye este grupo de serinas en la vida media de Nrf2 mediante un ensayo de pulso y caza con cicloheximida (CHX). Las células HEK293T fueron transfectadas con Nrf2<sup>ΔETGE-V5</sup> o Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A-V5</sup> y tratadas con CHX (40 μg/ml) durante los períodos de tiempo indicados. Como se observa en las Figs. 24A y B, la mutación de las seis serinas incrementó la vida media de Nrf2 hasta aproximadamente el doble (41 min vs. 78 min.). Se obtuvieron resultados similares analizando la vida media de un mutante que carece del dominio Neh6 completo, donde se localizan las seis serinas, Nrf2<sup>ΔETGEΔNeh6-V5</sup> (77 min) (Figs. 24C y D; (145)). Como confirmación adicional, se realizaron ensayos de pulso y caza con [<sup>35</sup>S]-metionina/[<sup>35</sup>S]-cisteína. Como se observa en las Figs. 24E y F, la vida media de Nrf2<sup>ΔETGE-V5</sup> y Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A-V5</sup> estimada por este método (58 y 82 min, respectivamente) fue similar a los resultados obtenidos mediante pulso y caza con CHX.

## 2.5 El mutante de Nrf2 que carece del grupo de seis serinas es insensible a la degradación inducida por el eje GSK-3/β-TrCP.

La relevancia estas serinas en la degradación mediada por GSK-3 fue estudiada



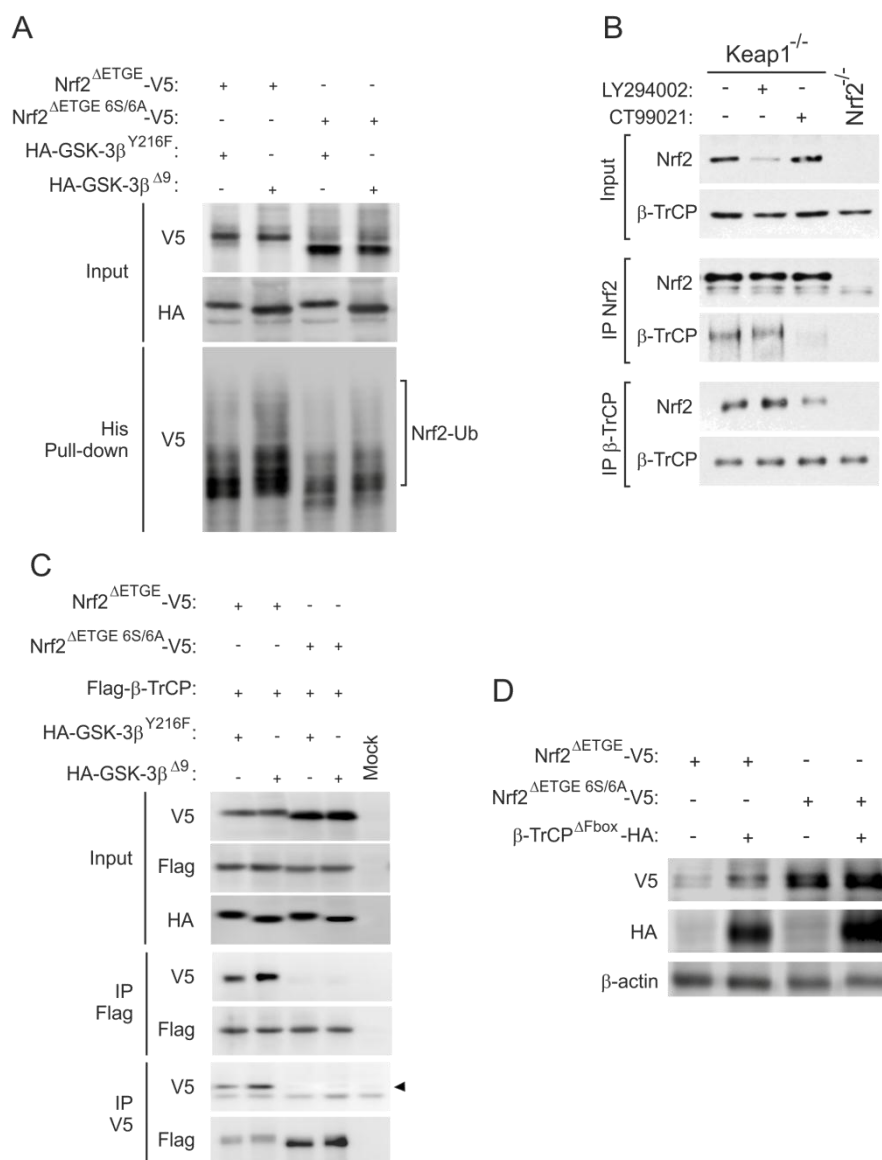
**Figure 25. Mutation of the 6S cluster within the Neh6 domain renders Nrf2 protein insensitive to GSK-3.**  
**A.** HEK293T cells were transfected with Nrf2<sup>ΔETGE-V5</sup> or Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A-V5</sup>, maintained in low-serum medium for 16 h and then incubated with 20 μM SB216763 for the indicated times. Upper blot, anti-V5 immunoblot; middle blot, β-catenin levels as a control of GSK-3 inhibition; lower blot, β-actin levels showing the similar protein load per lane. **B.** HEK293T cells were transfected with either with Nrf2<sup>ΔETGE-V5</sup> or Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A-V5</sup>. After 24 h they were further transfected with siRNAs for GSK-3α, GSK-3β, or both or with a control scramble siRNA as described in Materials and Methods. Cells were lysed 24 h after siRNA transfection. Upper blot, anti-V5 antibody; middle blot, GSK-3α and β protein levels; lower blot, β-actin levels showing similar protein load per lane.

## RESULTADOS

en células HEK293T transfectadas con Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 o Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5 y tratadas con SB216763 (20 μM, 3 o 6 h). Como esperábamos, la inhibición de GSK-3 aumentó los niveles de Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 (Fig. 25A). Sin embargo, el tratamiento no cambió de la cantidad de Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5. Con el fin de analizar la contribución de cada una de las dos isoformas de GSK-3, utilizamos siRNAs contra GSK-3α, GSK-3β, o contra ambas. Las células HEK293T fueron transfectadas con estos siRNAs y con Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 o Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5. El silenciamiento de cualquiera de estas dos isoformas dio lugar a un incremento en los niveles de Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5, pero no modificó los niveles de Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5 (Fig. 25B). En conjunto, estos datos muestran que los seis residuos de serina incluidos o adyacentes al dominio de destrucción por β-TrCP son necesarios para la degradación de Nrf2 inducida por GSK-3.

Con el objetivo de estudiar la ubiquitinación de Nrf2 en el dominio Neh6, las células HEK293T fueron transfectadas con Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 o Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5, His-Ub y GSK-3β inactiva o activa (HA-GSK-3β<sup>Y216F</sup> o HA-GSK-3β<sup>Δ9</sup>). Como se muestra en la Fig. 26A, HA-GSK-3β<sup>Δ9</sup> promovió un incremento en los niveles de ubiquitinación de Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5, pero, sin embargo, no produjo cambios en el patrón de ubiquitinación de Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5. Cabe destacar que todavía se detectó ubiquitinación de Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5, indicando la presencia de otros posibles dominios de degradación por el proteasoma, además de aquellos que implican la secuencia ETGE en el dominio Neh2 (regulado por Keap1) y el grupo de serinas del dominio Neh6 (regulado por β-TrCP).

A continuación nos propusimos analizar si la asociación entre Nrf2 y β-TrCP es dependiente de la acción de GSK-3. Con este fin, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación en MEFs Keap1<sup>-/-</sup>. La actividad de GSK-3 fue modulada por un lado, mediante activación indirecta por privación de suero o con LY294002 (10 μM, 2 h) y, por otro, mediante inhibición directa con CT99021 (5 μM, 2 h). Este inhibidor es reversible y competitivo de ATP (IC<sub>50</sub> 10 nM y 6.7 nM para GSK-3α y GSK-3β, respectivamente). Como se muestra en la Fig. 26B, los niveles basales de Nrf2 aumentaron ligeramente con CT99021 y disminuyeron con LY294002 o en ausencia de suero. También observamos que con GSK-3 activa la cantidad de β-TrCP asociada a Nrf2 inmunoprecipitado que con CT99021 (Fig. 26B). Alternativamente, cuando β-TrCP fue inmunoprecipitado, la cantidad de Nrf2 asociado fue mayor cuando GSK-3 estaba activa en ausencia de suero con LY294002, que cuando estaba inactivada con CT99021. Estas observaciones indican que la asociación entre Nrf2 y β-TrCP se fortalece cuando GSK-3 fosforila Nrf2.



**Figure 26. The 6S cluster within Neh6 domain is a target of β-TrCP in a GSK-3-dependet manner.** **A.** p100 dishes of HEK293T cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection, cells were submitted to MG132 treatment (40 μM) for 3 h. A whole-cell lysate (input) and an affinity-purified His-tagged fraction (His-pull-down) were blotted with anti-V5 antibody. Upper panel, anti-V5 input detection; middle panel, ectopically expressed HA-tagged GSK-3β; lower panel, anti-V5 detection in His-pull-down fractions. The bracket indicates the mobility of poly-ubiquitinated Nrf2-V5 (Nrf2-Ub) forms. **B.** Keap1<sup>-/-</sup> or Nrf2<sup>-/-</sup> MEF cells were serum starved for 6 h before they were treated for a further 2 h with vehicle control, 10 μM LY294002, or 5μM CT99021. Thereafter, the fibroblasts that had been subjected to different treatments were harvested separately, and each was lysed in 0.45 ml of buffer. A 50-μl portion of the lysate was retained as “input” (labeled on the left), and the remainder was immunoprecipitated with antibodies against either Nrf2 (labeled IP:Nrf2) or β-TrCP (labeled IP:β-TrCP) using Sepharose protein G beads. The immunoprecipitated material was analyzed by Western blotting using antibodies against Nrf2 or β-TrCP as indicated to the left of the blots. **C.** HEK293T cells were co-transfected with the indicated plasmids or with an empty vector (mock). One-fifth of whole protein lysates was used to control for protein expression as shown in the three upper panels. The rest of the protein lysates were immunoprecipitated with anti-Flag or anti-V5 antibodies and immunoblotted as indicated in the four lower panels. The arrow points the specific β-TrCP immunoreactive band. **D.** After co-transfection of HEK293T cells with either Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5 and β-TrCP<sup>ΔFbox</sup>-HA cells were maintained in low-serum medium for 16 h. Upper panel, anti-V5 antibody; middle panel, anti-HA antibody; lower panel, anti-β-actin antibody showing similar protein load.

## RESULTADOS

Se obtuvieron otras evidencias adicionales sobre la relevancia de las seis serinas del dominio Neh6 en la interacción Nrf2/ $\beta$ -TrCP utilizando un abordaje genético para modular la actividad de GSK-3. Las células HEK293T fueron transfectadas con un vector de expresión de  $\beta$ -TrCP con una etiqueta Flag (Flag- $\beta$ -TrCP), Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup> o Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup>, y HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup> o HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup> como se muestra en la Fig. 26C. Al cabo de 24 h, las células fueron tratadas con el inhibidor del proteasoma MG132 (40  $\mu$ M) durante 3 h. A continuación, las proteínas fueron inmunoprecipitadas con anticuerpo contra V5 o contra Flag. Observamos la asociación de Flag- $\beta$ -TrCP con Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup> pero no con Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup>. Además, en presencia de HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>, encontramos más Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup> unido a Flag- $\beta$ -TrCP, mientras que, de nuevo, no observamos asociación entre Flag- $\beta$ -TrCP y Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup>. Estos datos indican que  $\beta$ -TrCP no puede interaccionar con Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup> apoyando que este grupo de serinas es fundamental para la ubiquitinación y degradación de Nrf2.

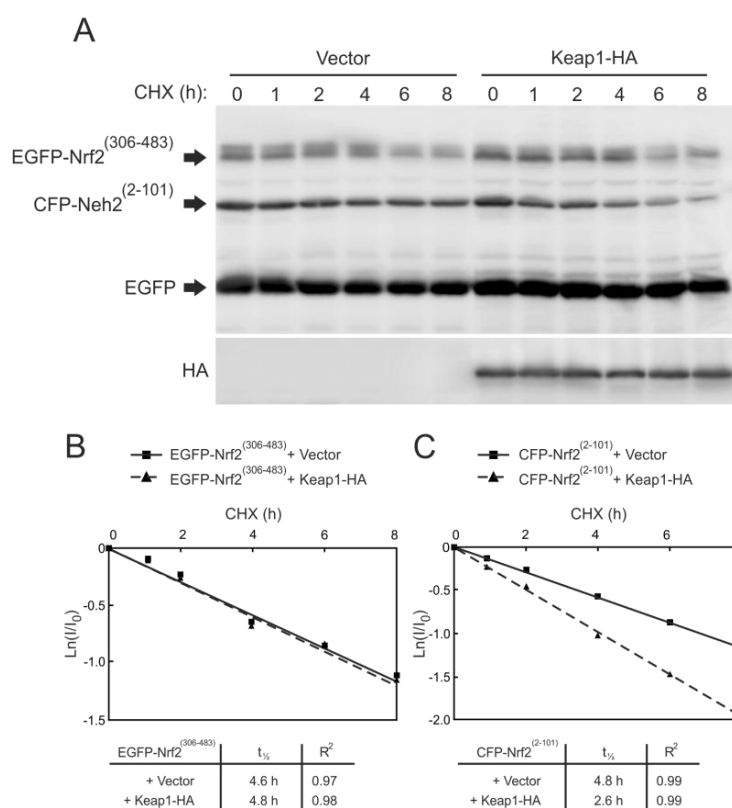
Finalmente, analizamos si la pérdida de asociación con  $\beta$ -TrCP alteraba los niveles de Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup>. Las células HEK293T fueron co-transfectadas con Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup> o con Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup> junto con el mutante de  $\beta$ -TrCP,  $\beta$ -TrCP <sup>$\Delta$ Fbox</sup>-HA (Fig. 26D). Como ya se había mostrado anteriormente,  $\beta$ -TrCP <sup>$\Delta$ Fbox</sup>-HA aumenta los niveles de Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup>. Aunque los niveles basales de Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup> fueron superiores a los de Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup>, estos no se vieron modificados por la co-expresión de  $\beta$ -TrCP <sup>$\Delta$ Fbox</sup>-HA, sugiriendo que SCF/ $\beta$ -TrCP modula la estabilidad de Nrf2 a través de las seis serinas del dominio Neh6.

### 3 Análisis estructural del complejo de degradación Nrf2/ $\beta$ -TrCP por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Como hemos visto anteriormente  $\beta$ -TrCP necesita que Nrf2 sea fosforilado por GSK-3 para reconocerlo. Utilizando diferentes abordajes, que incluyen la electroforesis bidimensional (2D-PAGE) y la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), hemos identificado los residuos fosforilados por GSK-3 que están implicados en la unión con  $\beta$ -TrCP. Además hemos caracterizado las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas entre Nrf2 y  $\beta$ -TrCP.

### 3.1 El dominio Neh6 es responsable de la degradación de Nrf2 dependiente de $\beta$ -TrCP.

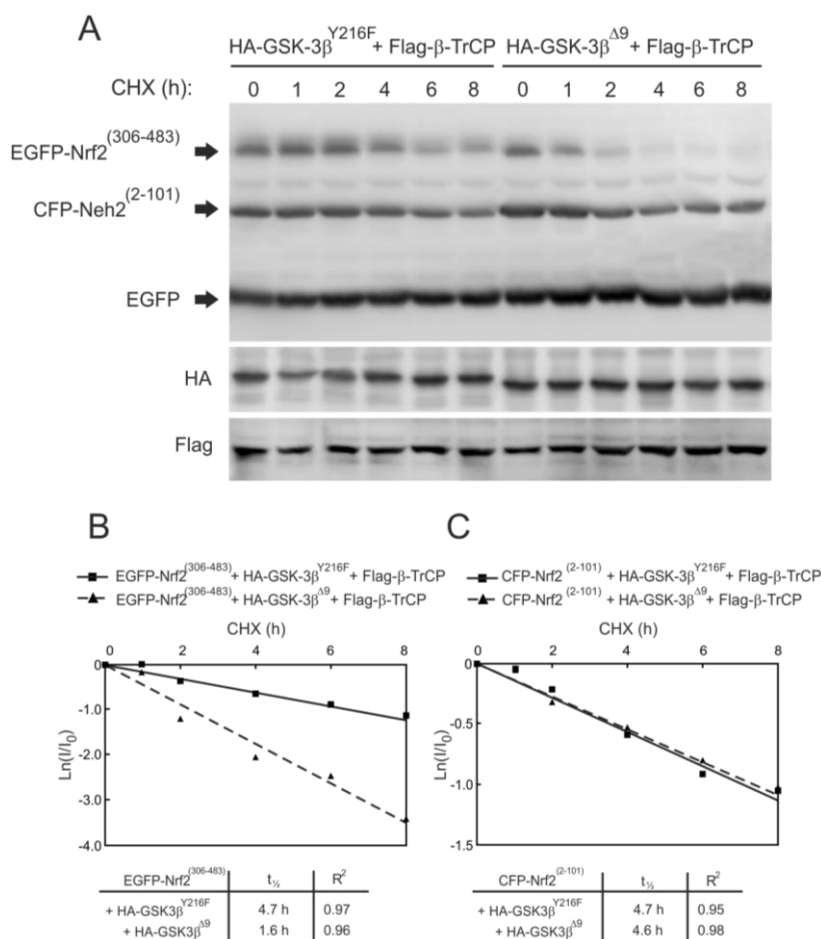
Para explorar más a fondo la degradación de Nrf2 a través de sus dominios Neh2 y Neh6, se generaron dos construcciones que contienen estos dominios fusionados a las proteínas cian (CFP) y verde (EGFP) fluorescentes, respectivamente. La CFP presenta en la posición 66 una Tyr, mientras que la CFP tiene un Trp. Esta diferencia promueve un cambio en los patrones de excitación y emisión, siendo, para la EGFP de 488 y 507 nm, y para la CFP, 433 y 475 nm, respectivamente. Sin embargo, ambas proteínas presentan propiedades similares, de manera que utilizamos sólo EGFP de control. El vector de expresión CFP-Nrf2<sup>(2-101)</sup> contiene el dominio Neh2 desde los aminoácidos 2 al 101, y el vector EGFP-Nrf2<sup>(306-483)</sup> contiene el dominio Neh6 desde el residuo 306 hasta el 483 de Nrf2. Estos vectores de expresión fueron utilizados para examinar si los dominios Neh2 y Neh6 desestabilizan ambas proteínas fluorescentes y además pueden ser reguladas de manera independiente en presencia de las E3 ligasas correspondientes, Keap1 o  $\beta$ -TrCP.



**Figure 27. Keap1 reduces the half-life of Nrf2 through the Neh2 domain but not through the Neh6 domain.** **A**, HEK293T cells were co-transfected with empty vector or HA-tagged Keap1 expression vector, together with EGFP-Nrf2<sup>(306-483)</sup> o CFP-Nrf2<sup>(2-101)</sup> and EGFP as a control. After transfection cells were maintained in low serum medium for 16 h and then treated with 100  $\mu$ g/ml CHX for the indicated times. Upper panel, immunoblot with anti-GFP antibody. Arrows indicate the positions of EGFP-Neh6, CFP-Neh2 and EGFP. Lower panel, anti-HA antibody showing expression of Keap1-HA. **B** and **C**, Natural logarithm of relative levels of the chimeric EGFP-Nrf2<sup>(306-483)</sup> and CFP-Nrf2<sup>(2-101)</sup> proteins as a function of CHX chase time. The protein half-life was determined in the linear range of the degradation curve.

## RESULTADOS

Las células HEK293T fueron co-transfectadas con EGFP-Nrf2<sup>(306-483)</sup> o CFP-Nrf2<sup>(2-101)</sup>, EGFP, como control de la transfección, y con vector vacío (pcDNA3.1-V5/HisB) o con Keap1 (pcDNA3.1-Keap1-HA/HisC). A continuación, fueron tratadas con cicloheximida (CHX) (100 µg/ml) durante los tiempos indicados en las Figs. 27A-C. La proteína EGFP no cambió durante el tratamiento con CHX. Por el contrario, las fusiones con Neh2 y Neh6 confirieron inestabilidad a las proteínas CFP y EGFP, con vidas medias de 4.8 y 4.6 h, respectivamente. Además, en las células co-transfectadas con Keap1-HA, observamos que la vida media de la proteína CFP-Nrf2<sup>(2-101)</sup> se redujo hasta 2.6 h, mientras que la de EGFP-Nrf2<sup>(306-483)</sup> no se modificó. Estos resultados indican que ambos dominios de degradación son funcionales, actúan de un modo independiente y confirman que el dominio Neh2, pero no el Neh6, es regulado por Keap1.



**Figure 28. GSK-3 reduces the half-life of Nrf2 through the Neh6 domain but not through the Neh2 domain.** **A**, HEK293T cells were co-transfected with expression vectors for HA-tagged inactive mutant GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup> or constitutively active GSK-3 $\beta$ <sup>Δ9</sup>, together with Flag- $\beta$ -TrCP, EGFP-Nrf2<sup>(306-483)</sup> or CFP-Nrf2<sup>(2-101)</sup> and EGFP as a control. After transfection cells were maintained in low-serum medium for 16 h and then treated with 100 µg/ml CHX for the indicated times. Upper panel, immunoblot with anti-GFP antibody. Arrows indicate the positions of EGFP-Nrf2<sup>(306-483)</sup> or CFP-Nrf2<sup>(2-101)</sup> and EGFP. Middle panel, anti-HA antibody showing expression of HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup> and HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Δ9</sup>. Lower panel, anti-Flag antibody showing expression of Flag- $\beta$ -TrCP. **B** and **C**, Natural logarithm of relative levels of the chimeric EGFP-Nrf2<sup>(306-483)</sup> and CFP-Nrf2<sup>(2-101)</sup> proteins as a function of CHX chase time. The protein half-life has been determined in the linear range of the degradation curve.

A continuación, analizamos la estabilidad de estas proteínas quimera en función de la activación de la vía GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -TrCP. Para ello, las células HEK293T fueron co-transfectadas con EGFP-Nrf2<sup>(306-483)</sup> o CFP-Nrf2<sup>(2-101)</sup>, EGFP como control, Flag- $\beta$ -TrCP y HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup> o HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>. Tras 16 h, las células fueron tratadas con cicloheximida (CHX) (100  $\mu$ g/ml) durante los tiempos indicados (Figs. 28A-C). La presencia de GSK-3 $\beta$  activa y  $\beta$ -TrCP aceleró sólo la degradación de EGFP-Nrf2<sup>(306-483)</sup>, cambiando su vida media de 4.7 a 1.6 h, no modificando la vida media de la proteína CFP-Nrf2<sup>(2-101)</sup>. Por tanto, estos resultados indican que el dominio Neh6, pero no el Neh2, está regulado por la ruta GSK-3/ $\beta$ -TrCP.

### **3.2 Identificación de los residuos de serina del dominio Neh6 que se fosforilan por GSK-3.**

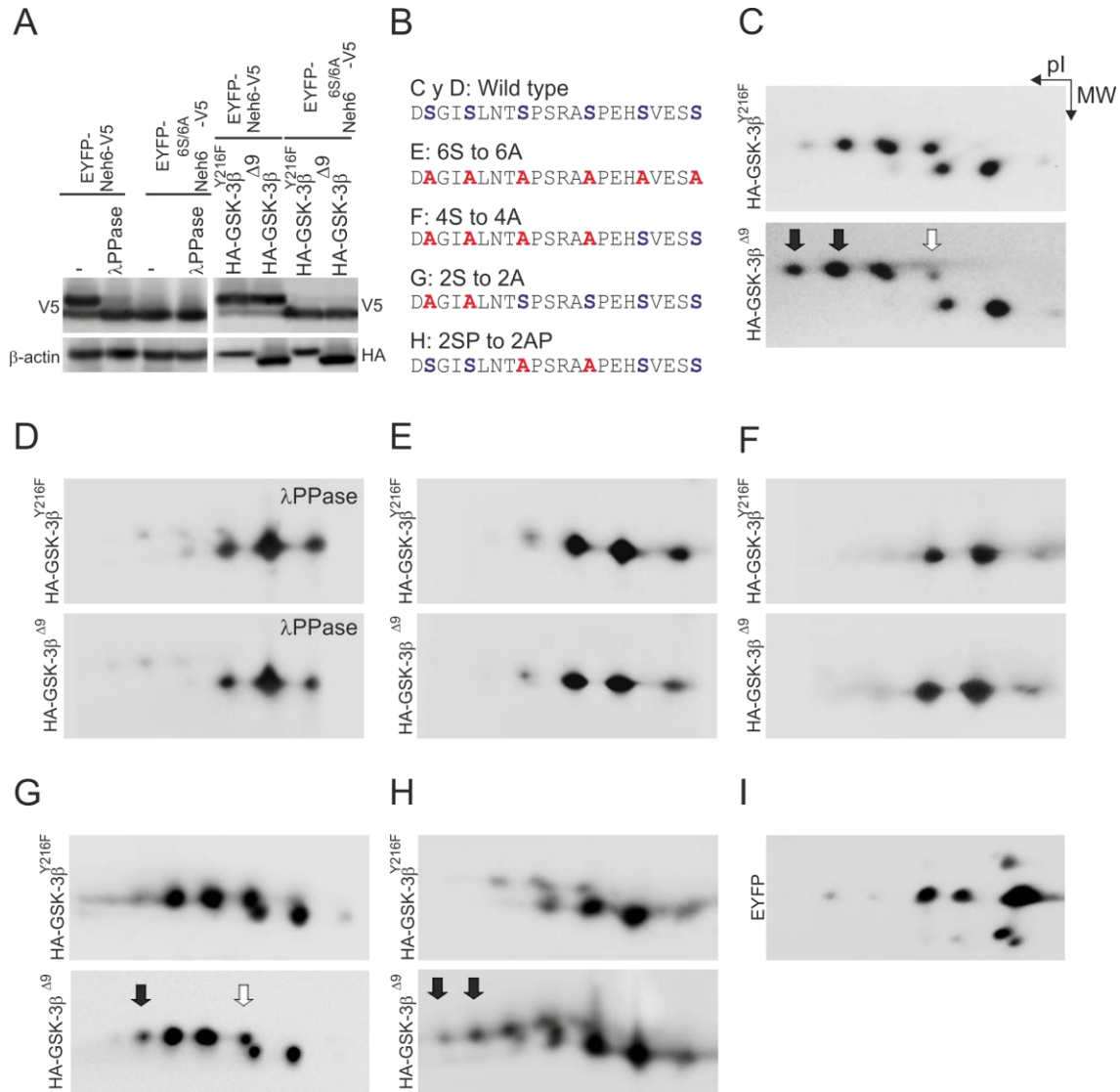
Continuando con la caracterización del dominio Neh6 de Nrf2, analizamos la participación de cada uno de los seis residuos de serina en la fosforilación de Nrf2 por GSK-3. El hecho de que Nrf2 contenga varios sitios putativos de fosforilación por GSK-3 complica la identificación exacta de los que se fosforilan en el dominio Neh6. Para simplificar esta tarea generamos una proteína quimera que contiene los residuos 317-372 de Nrf2 fusionados a la proteína fluorescente amarilla (EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5). Esta proteína forma un doblete cuando se resuelve mediante SDS-PAGE (Fig. 29A). La banda con mayor retraso electroforético correspondía a la forma fosforilada puesto que esta banda desapareció cuando los lisados se trataron con fosfatasa  $\lambda$  ( $\lambda$ PPasa). Cuando mutamos los seis residuos de serina a alanina (residuos 335, 338, 342, 347, 351 y 355) (EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 6S/6A-V5), obtuvimos un patrón diferente puesto que sólo vemos una banda, indicando que al menos alguna de estas seis serinas estaba fosforilada en EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5.

A continuación analizamos el patrón de movilidad electroforética de ambas versiones de Nrf2 en presencia de la quinasa GSK-3. Para ello, las células HEK293T fueron transfectadas con EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 o EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>6S/6A-V5 y con HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup> o HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>. Como se observa en la Fig. 29A, esta técnica no permitió apreciar cambios en el patrón de movilidad electroforética de ninguna de las dos versiones de Nrf2 en presencia de GSK-3 $\beta$  activa y por tanto decidimos emplear geles bidimensionales de poliacrilamida. La electroforesis bidimensional nos permite separar las proteínas en función de su punto isoelectrico, pI, y su masa molecular. Las células HEK293T fueron transfectadas con EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 y la versión activa de GSK-3, HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup> o con la inactiva HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup>. Las células transfectadas con la versión inactiva de GSK-3 $\beta$



## RESULTADOS

fueron mantenidas en presencia del inhibidor SB216763 durante 3 h para garantizarnos la inactividad de GSK-3 endógena. Como se muestra en el panel superior de la Fig. 29C, en presencia de GSK-3 $\beta$  inactiva, EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 muestra dos filas de puntos con diferentes valores de pI y masa molecular. Sin embargo, si pre-incubamos los lisados con



**Figure 29. The *Neh6* domain is phosphorylated by GSK-3 $\beta$ .** **A**, On the left side immunoblots, HEK293T cells were transfected with expression vectors for EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 and mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 6S/6A-V5. Cell lysates were incubated with  $\lambda$ PPase as indicated and resolved by one-dimensional SDS-PAGE. Upper panel, immunoblot with anti-V5 antibody. Lower panel, immunoblot with anti- $\beta$ -actin antibody to check equal protein loading. On the right side immunoblots, HEK293T cells were co-transfected with expression vectors for EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 and mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 6S/6A-V5 together with either inactive HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup>, as a negative control, or constitutively active HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>. Upper panel, immunoblot with anti-V5 antibody. Lower panel, immunoblot with anti-HA antibody. **B**, Comparison of mNrf2 sequences from wild-type and mutant EYFP chimeras examined in panels C-H. **C**, 2D-PAGE analysis of EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 in the presence of either inactive HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup> or active HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>. **D**, same lysates as in C after treatment with  $\lambda$ PPase. **E-H**, 2D-gel analysis of mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 6S/6A-V5 (**E**), mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 4S/4A-V5 (**F**), mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 2SP/2AP-V5 (**G**) and mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 2S/2A-V5 (**H**), in the presence of inactive HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup> or active HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>. In **C**, **G** and **H**, filled arrows indicate acidic spots that result from GSK-3 phosphorylation. Empty arrow indicates spots whose intensity is reduced in the presence of HA-GSK3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup> as a result of protein migration towards that acidic spots. **I**, 2D-PAGE analysis of the mobility pattern of EYFP.



fosfatasa  $\lambda$ , la proteína presentó un patrón diferente, quedando reducido a tres puntos (Fig. 29D, panel superior). Estos resultados nos permiten dilucidar dos observaciones: por un lado, otras quinasas deben participar también en la fosforilación de EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 ya que la inhibición de GSK-3 redujo pero no anuló el número de puntos sensible a fosfatasa  $\lambda$ , y por otro, indica la presencia de modificaciones postraduccionales que influyen en el punto isoeléctrico y que no son debidas a fosforilación puesto que no se perdieron con fosfatasa  $\lambda$ . Para determinar si estas modificaciones pertenecen a la proteína EYFP o al fragmento de Nrf2, se transfectó únicamente pEYFP-C1. Como se observa en la Fig. 29I, la proteína EYFP presentó un patrón similar al de las versiones de EYFP-Nrf2 tratadas con fosfatasa  $\lambda$ , demostrando que los tres puntos son debidos a modificaciones de EYFP y no del fragmento procedente de Nrf2. Finalmente, cuando las células fueron co-transfectadas con EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 y GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$  se observó un incremento en los puntos con pI más ácido, hiperfosforilados (Fig. 29C, panel inferior, flechas negras), mientras que se redujo la intensidad de los puntos con pI más básico, hipofosforilados (Fig. 29C, panel inferior, flechas blancas). Estos resultados indican que GSK-3 fosforila Nrf2 en el dominio Neh6.

Para acotar entre estas seis serinas los sitios concretos de fosforilación, analizamos el patrón de diferentes versiones mutadas de EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 (Fig. 29B). Como se muestra en la Fig. 29E, independientemente de la presencia de GSK-3, el mutante EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 6S/6A-V5 presentó un patrón de movilidad electroforética similar al de EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 tratado con fosfatasa  $\lambda$ . Estos resultados sugieren que algunas de estos residuos son serinas fosforiladas por varias quinasas entre las que se incluye GSK-3. La proteína EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 4S/4A-V5, con las mutaciones S335A, S338A, S342A y S347A, mostró el mismo patrón de fosforilación que EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 6S/6A-V5 independientemente de la activación de GSK-3 (Fig. 29F), indicando que los residuos Ser<sup>351</sup> y Ser<sup>355</sup> no participan en la fosforilación del dominio Neh6. A continuamos, analizamos el patrón del mutante con las serinas Ser<sup>335</sup> y Ser<sup>338</sup> cambiadas a alaninas (EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 2S/2A-V5). En ausencia de GSK-3 activa, esta proteína conservó el patrón de fosforilación de la versión silvestre (Fig. 29G). Sin embargo, con GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$  se produjo un modesto incremento en el tamaño de los puntos más ácidos (Fig. 29G, panel inferior, flechas negras) y una leve disminución en los puntos más básicos (Fig. 29G, panel inferior, flechas blancas). Estos resultados indican que los residuos Ser<sup>342</sup> y Ser<sup>347</sup> pueden ser fosforilados no sólo por GSK-3 sino también por otras quinasas. Por último, estudiamos el patrón de una versión con las serinas Ser<sup>342</sup> y Ser<sup>347</sup> mutadas a Ala (EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup> 2SP/2AP-V5). Como se observa en la Fig. 29H, en ausencia de GSK-3 este

## RESULTADOS

mutante presentó un patrón muy parecido al de EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 tratado con fosfatasa  $\lambda$ . Por contra, fue sensible a fosforilación por GSK-3 $\beta$ <sup>49</sup>, dado que en su presencia aparecieron nuevos puntos en la zona más ácida (Fig. 29H, panel inferior, flechas negras). En conjunto, estos resultados nos indican que las Ser<sup>342</sup> y Ser<sup>347</sup> están fosforiladas por varias quinasas, entre las que se incluyen GSK-3. Además demuestran que GSK-3 fosforila directamente las Ser<sup>335</sup> y Ser<sup>338</sup> del dominio DSGIS.

### 3.3 Identificación por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de las fosfoserinas del dominio Neh6 que interaccionan con $\beta$ -TrCP.

La determinación de la estructura de las proteínas mediante RMN incluye la preparación de la muestra, la asignación de las resonancias, generación de restricciones y el cálculo de la estructura y validación de la misma. Algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región espectral de las radiofrecuencias (3 kHz-300 GHz). Un requisito imprescindible es que los núcleos deben tener un momento magnético distinto de cero. Esta condición se cumple para los núcleos con número másico y número atómico impar como son:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{15}\text{N}$ . El isótopo de estudio debe ser abundante en la naturaleza, ya que la intensidad de la señal dependerá de su concentración. Por eso, uno de los más utilizados en la elucidación de estructuras es el  $^1\text{H}$  y en menor medida el  $^{13}\text{C}$ . Como la frecuencia exacta de la absorción de absorben radiación electromagnética depende del entorno de estos núcleos, este parámetro se puede emplear para determinar la estructura de la molécula.

Para realizar los espectros de RMN, utilizamos dos fosfopéptidos derivados de Nrf2 humano, designados 4P-hNrf2 y 2P-hNrf2. La secuencia de Nrf2 humana es más larga que la de ratón, y por ello, el dominio Neh6 de humano está desplazado 9 residuos hacia el extremo C-terminal. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos es similar en la región de Nrf2 analizada (Fig. 30A). El fosfopéptido 4P-hNrf2 contiene 4 residuos de serina fosforilados en las posiciones 344, 347, 351 y 356 (equivalentes a las posiciones 335, 338, 342 y 347 de ratón) mientras que el fosfopéptido 2P-hNrf2 contiene sólo 2 residuos de serina fosforilados en las posiciones 344 y 347, correspondientes a las dos fosforilaciones inducidas selectivamente por GSK-3 (Fig. 30A). Todos los espectros de RMN de los péptidos de Nrf2 libres en solución o en presencia de la proteína de fusión MBP- $\beta$ -TrCP fueron analizados a pH 7.2 y a 280 K (7 °C). En algunos casos, los espectros se repitieron a 293 K (20 °C) y 310 K (37 °C) con el fin de afianzar los resultados obtenidos.

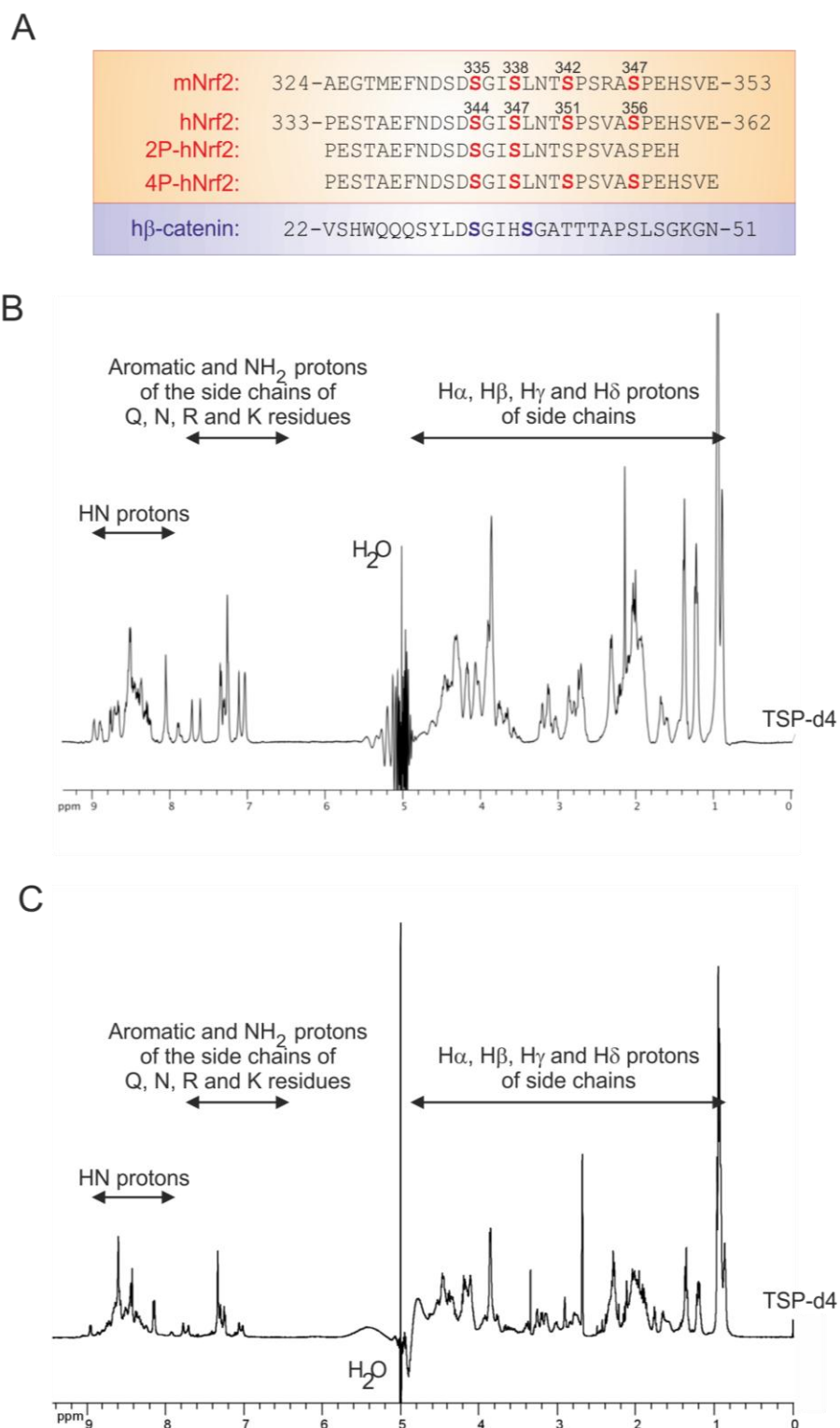
### 3.3.1 Estudio de los péptidos 2P-hNrf2 y 4P-hNrf2 libres en solución.

Antes de comenzar el estudio de la interacción entre Nrf2 y  $\beta$ -TrCP, fue necesario estudiar los péptidos libres en solución para visualizar posteriormente los cambios producidos por la adición de la proteína  $\beta$ -TrCP. Los espectros monodimensionales 1D  $^1\text{H}$  presentan distintas zonas características en las que resuenan los diferentes tipos de protones de los péptidos y proteínas (Figs. 30B y C):

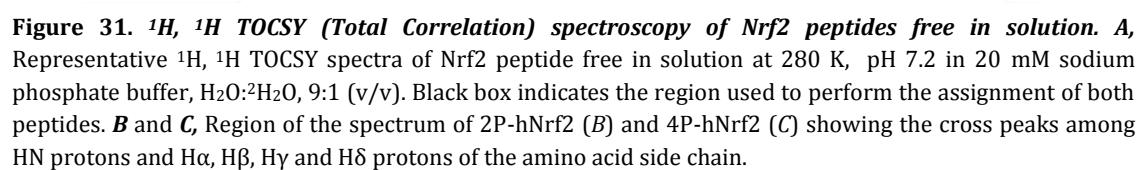
- Zona de los protones amida, HN (de 9 a 7.9 ppm).
- Zona de los protones aromáticos y de los grupos  $\text{NH}_2$  de las cadenas laterales de la asparagina, glutamina, arginina y lisina (de 7.7 a 6.5 ppm).
- Zona de los protones  $\text{H}\alpha$ ,  $\text{H}\beta$ ,  $\text{H}\gamma$  y  $\text{H}\delta$  de las cadenas laterales del resto de aminoácidos (de 4.9 a 0.9 ppm).

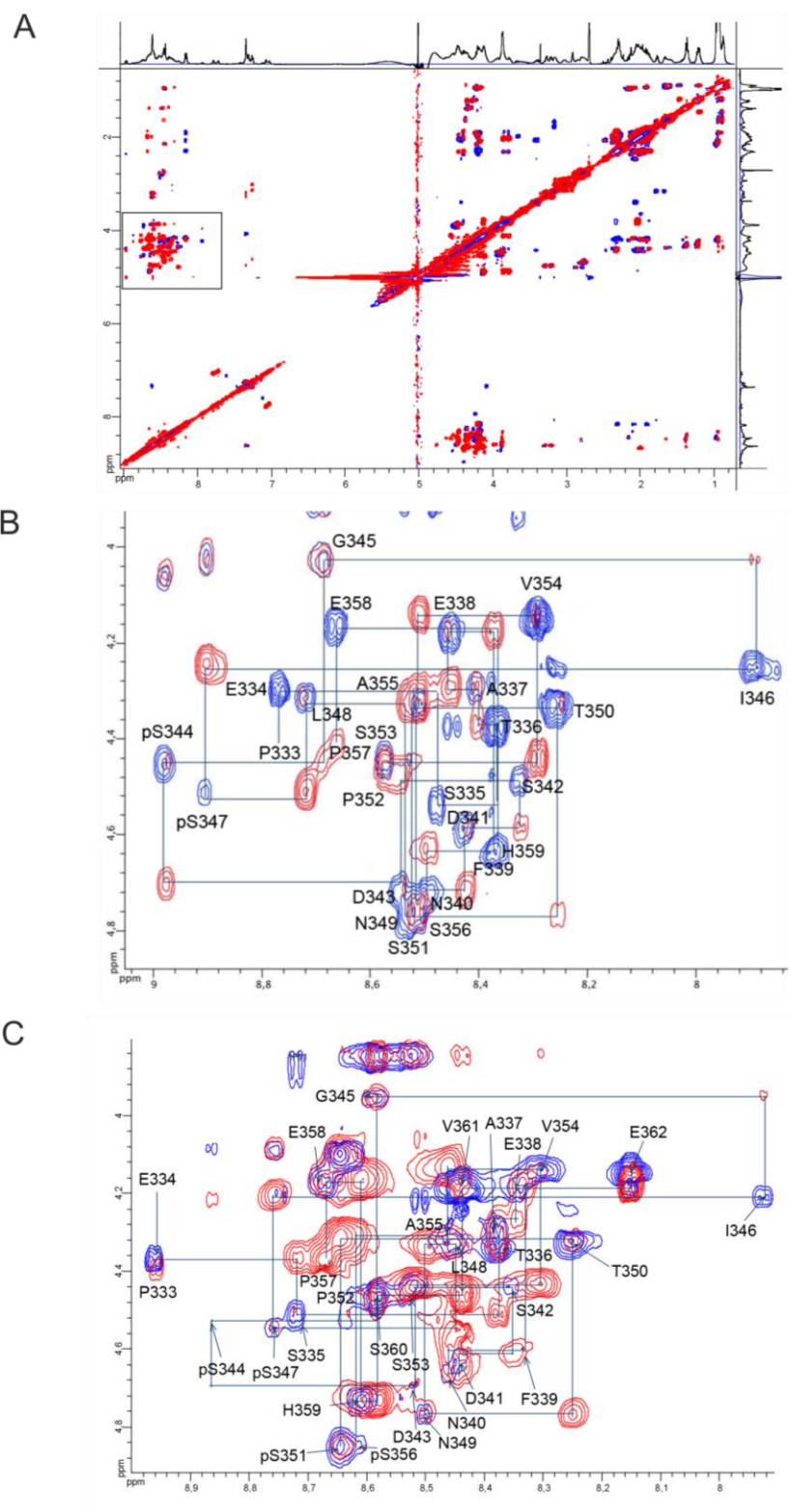
Debido al tamaño de los péptidos, de 27 y 30 aminoácidos, y por lo tanto, al gran número de protones que los componen, con este tipo de espectros las señales aparecen muy solapadas, lo que dificulta la asignación individual de cada señal a un protón concreto. Para solventar este problema se adquirieron espectros bidimensionales  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  TOCSY de correlación escalar (*Total Correlation Spectroscopy*) (Fig. 31A). El estudio de las correlaciones entre los picos de los protones amida HN, y los de los protones  $\text{H}\alpha$ ,  $\text{H}\beta$ ,  $\text{H}\gamma$  y  $\text{H}\delta$  de las cadenas laterales nos permitió la identificación de los sistemas de espín que contiene cada péptido. Un sistema de espín está formado por un grupo de protones escalaramente acoplados. Esto significa que cada tipo de aminoácido conforma un sistema de espín característico. El análisis de los espectros nos permitió identificar todos los sistemas de espín de los 27 residuos de 2P-hNrf2 (Fig. 31B) y de los 30 residuos de 4P-hNrf2 (Fig. 31C). En total, encontramos 13 patrones distintos dado que ambos péptidos presentan 13 tipos de aminoácidos distintos. La asignación de estos patrones de resonancia está basada en las tablas de desplazamiento químico diseñadas por Kurt Wüthrich (223). Estas tablas muestran los valores del desplazamiento químico de cada uno de los 20 aminoácidos comunes dispuestos en un péptido ideal de estructura aleatoria o *random coil*,  $\text{H-Gly-Gly-X-Ala-OH}$ , donde X representa cada aminoácido en particular.

Sin embargo, la asignación aún está incompleta puesto que hasta ahora podemos hacer una clasificación por tipo de aminoácido, pero no podemos saber qué picos de estos espectros corresponden a un aminoácido en concreto. Para terminar la asignación, se utilizaron espectros 2D NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) (Fig. 32A). Los



**Figure 30. Structural analysis for the Nrf2/β-TrCP complex by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy.** **A**, Sequence of 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2 phosphopeptides from human Nrf2; for reference of amino acid positions, the mouse Nrf2 sequence is also shown. In addition, the human β-catenin sequence is included for comparison. **B** and **C**, Representative 1D <sup>1</sup>H spectrum of 2P-hNrf2 (**B**) and 4P-hNrf2 (**C**) free in solution at 280 K, pH 7.2 in 20 mM sodium phosphate buffer, H<sub>2</sub>O:<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, 9:1 (v/v). Chemical shifts (in ppm) were referenced to internal TSP-d4 [3-(trimethylsilyl)propionic acid-2,2,3,3-d4 sodium salt].

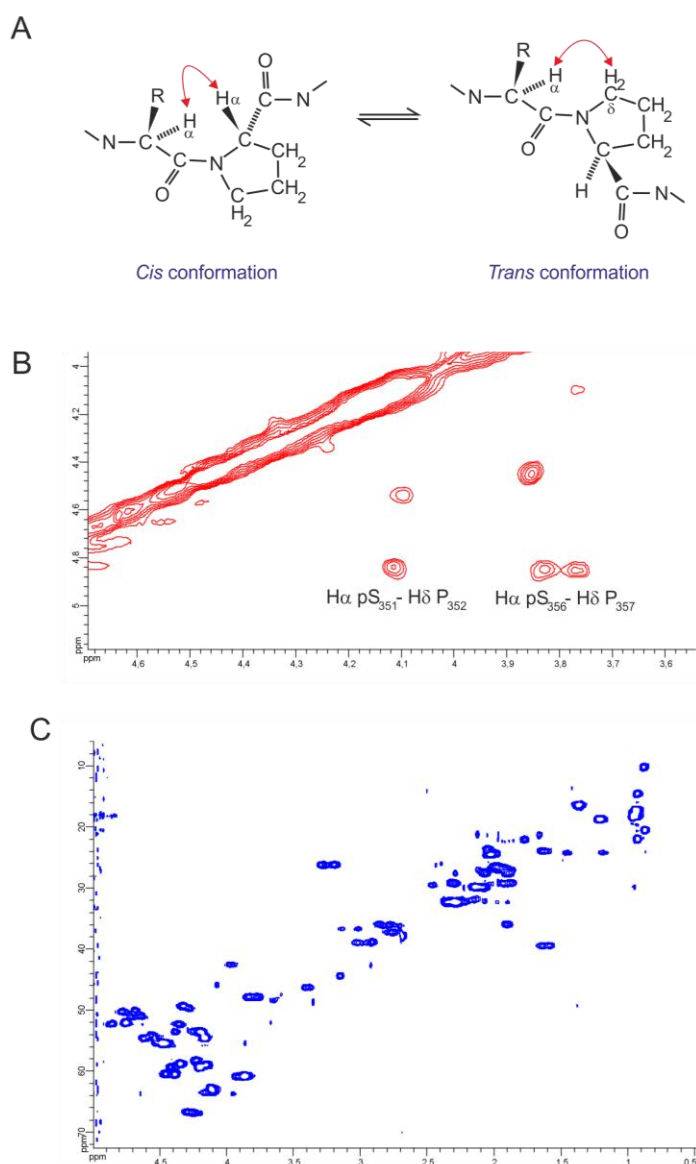




**Figure 32.**  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  NOESY (Nuclear Overhauser Effect) spectroscopy of Nrf2 peptides free in solution. **A**, Representative  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  TOCSY (blue) y  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  NOESY (red) spectra of Nrf2 peptide free in solution at 280 K, pH 7.2 in 20 mM sodium phosphate buffer,  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ , 9:1 (v/v). Black box indicates the region used to perform the sequential assignment of both peptides. **B** and **C**, The correlations between TOCSY and NOESY cross peaks of HN, H $\alpha$  and H $\beta$  resonances of 2P-hNrf2 (**B**) and 4P-hNrf2 (**C**) allows sequential assignment of the residues for each peptide (see black line). Note that this line is interrupted at the prolines 333, 352 y 357, because of the absence of HN protons.



experimentos 2D NOESY correlacionan protones que están próximos en el espacio ( $< 5\text{\AA}$ ) y, por lo tanto, su análisis combinado con el del espectro 2D TOCSY nos permite completar la asignación de cada sistema de espín con el aminoácido concreto de la secuencia de ambos péptidos. Utilizando las correlaciones NOE  $\text{HN}_x\text{-H}\alpha_{x-1}$  (Figs. 32B y C), pudimos vincular un residuo cualquiera X con el residuo anterior X-1, y así, determinar secuencialmente la cadena peptídica de cada péptido libre (línea continua marcada en los espectros). El único obstáculo para analizar secuencialmente los péptidos, fue la presencia de tres residuos de prolina, una en el extremo N-terminal y las otras distribuidas a lo largo del péptido. Como consecuencia de la falta de protones HN en las prolinas no es posible encontrar una correlación NOE  $\text{HN}_x\text{-H}\alpha_{x-1}$  para este aminoácido. Por lo tanto, fue necesario encontrar otra correlación secuencial entre cada residuo de prolina y el precedente, donde tuvimos en cuenta que los residuos de prolina pueden encontrarse en dos conformaciones distintas, *cis* y *trans* (Fig. 33A). La isoforma *cis* se identifica por la presencia de un pico cruzado NOE entre el  $\text{H}\alpha$  de la Pro y el  $\text{H}\alpha$  del residuo en posición Pro-1. Sin embargo, la isoforma *trans* presenta un pico cruzado NOE entre el  $\text{H}\delta$  de la Pro y el  $\text{H}\alpha$  del residuo Pro-1. Mayoritariamente, las prolinas se encuentran en forma *trans* (223). El análisis de los picos NOE  $\text{H}\delta_{\text{Pro}}\text{-H}\alpha_{\text{Pro-1}}$  indicó que las prolinas se encuentran en configuración *trans* (Fig. 33B). No se detectaron isomerizaciones *cis-trans*. Con este conjunto de resultados, se elaboraron las tablas de los desplazamientos químicos correspondientes a la asignación de las posiciones de los protones en la secuencia de aminoácidos de ambos péptidos libres en solución (Tablas 4 y 5). Adicionalmente, se realizaron espectros  $^{13}\text{C}$ -HSQC (217) sobre muestras con abundancia natural de  $^{13}\text{C}$  para reasignar las secuencias y confirmar los resultados anteriores (Fig. 33C y tablas 6 y 7).



**Figure 33. Analysis of the conformation of the Pro residues of 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2. <sup>13</sup>C-HSQC spectroscopy for the assignment of resonances. A,** *Cis* and *trans* conformations of the proline residues. **B,** Expansion of the <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H NOESY spectrum which allows identifying the NOE cross peaks Hα<sub>Pro</sub> - Hα<sub>X-1</sub> or Hδ<sub>Pro</sub> - Hα<sub>X</sub> of the prolines. Nrf2 peptides only present Hα<sub>Pro</sub> - Hα<sub>X-1</sub> correlations indicating that both prolines, Pro<sup>352</sup> and Pro<sup>357</sup>, are in *trans* conformation. Due to the fact that Pro<sup>333</sup> is the first residue of both Nrf2 peptides, we cannot detect this kind of cross peaks. **C,** Representative <sup>13</sup>C-HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) spectrum of Nrf2 peptide free in solution recorded at 280 K, pH 7.2 in 20 mM sodium phosphate buffer, H<sub>2</sub>O:<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, 9:1 (v/v).



Residue	HN	H $\alpha$	H $\beta$	Others
CH <sub>3</sub> CO				CH <sub>3</sub> 2.14
P333		4.42	2.31	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.02; CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.67
E334	8.77	4.32	1.97; 2.10	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.32
S335	8.48	4.55	3.91	
T336	8.37	4.39	4.30	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 1.24
A337	8.41	4.31	1.37	
E338	8.46	4.20	1.88; 2.09	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.20
F339	8.38	4.65	3.04; 3.13	H $\delta$ 7.26; H $\epsilon$ 7.36; H $\zeta$ 7.31
N340	8.50	4.74	2.70; 2.81	NH <sub>2</sub> $\gamma$ 7.05; 7.72
D341	8.43	4.60	2.68	
S342	8.33	4.50	3.85; 3.95	
D343	8.55	4.73	2.71	
pS344	8.98	4.47	4.08	
G345	8.69	3.92; 4.05		
I346	7.90	4.27	1.92	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 1.20; 1.46; CH <sub>3</sub> $\gamma$ 0.95; CH <sub>3</sub> $\delta$ 0.88
pS347	8.91	4.52	4.04	
L348	8.72	4.33	1.67	H $\gamma$ 1.60; CH <sub>3</sub> $\delta$ 0.93
N349	8.52	4.77	2.87	NH <sub>2</sub> $\gamma$ 7.03; 8.05
T350	8.26	4.34	4.27	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 1.22
S351	8.52	4.77	3.87	
P352		4.49	2.33	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.04; CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.74
S353	8.58	4.46	3.87	
V354	8.29	4.16	2.10	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 0.95
A355	8.51	4.34	1.38	
S356	8.54	4.78	3.87	
P357		4.44	2.31	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.02; CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.76; 3.85
E358	8.67	4.18	1.93	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.14; 2.23
H359	8.36	4.64	3.12; 3.22	2H $\delta$ 7.12; 1H $\epsilon$ 8.07
CONH <sub>2</sub>				7.27; 7.64

**Table 4.** *<sup>1</sup>H NMR chemical shifts of the free 2P-hNrf2 peptide in ppm from TSP-d<sub>4</sub>.* Spectra were recorded at 280 K, pH = 7.2, and 20 mM sodium phosphate buffer; H<sub>2</sub>O:<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, 9:1 (v/v).

## RESULTADOS

Residue	HN	H $\alpha$	H $\beta$	Others
CH <sub>3</sub> CO				CH <sub>3</sub> 2.12
P333		4.42	2.46	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.05; CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.38
E334	8.96	4.37	1.94; 2.08	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.30
S335	8.72	4.51	3.87	
T336	8.37	4.34	4.29	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 1.19
A337	8.38	4.30	1.32	
E338	8.34	4.17	1.89; 2.08	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.14; 2.23
F339	8.33	4.60	3.00; 3.12	H $\delta$ 7.25; H $\epsilon$ 7.33; H $\zeta$ 7.28
N340	8.46	4.67	2.68; 2.79	NH <sub>2</sub> $\gamma$ 7.02; 7.71
D341	8.44	4.62	2.74	
S342	8.35	4.45	3.83; 3.92	
D343	8.52	4.70	2.75; 2.84	
pS344	8.86	4.53	4.08	
G345	8.59	3.96		
I346	7.94	4.20	1.92	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 1.19; CH <sub>3</sub> $\gamma$ 0.95; CH <sub>3</sub> $\delta$ 0.89
pS347	8.76	4.54	4.08	
L348	8.45	4.33	1.64	H $\gamma$ 1.60; CH <sub>3</sub> $\delta$ 0.87; 0.92
N349	8.50	4.76	2.75; 2.84	NH <sub>2</sub> $\gamma$ 7.06; 7.78
T350	8.24	4.32	4.25	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 1.20
pS351	8.64	4.85	4.10	
P352		4.44	2.30	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 1.93; CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.87
S353	8.53	4.50	3.84	
V354	8.30	4.15	2.07	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 0.92
A355	8.46	4.31	1.37	
pS356	8.62	4.85	4.10	
P357		4.37	2.31	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 1.86; CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.79
E358	8.67	4.17	1.96; 2.01	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.29; 2.33
H359	8.60	4.73	3.19; 3.29	2H $\delta$ 7.30; 1H $\epsilon$ 8.59
S360	8.58	4.46	3.84	
V361	8.43	4.18	2.13	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 0.96
E362	8.15	4.16	1.87	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.04; 2.27
CONH <sub>2</sub>				7.11; 7.59

**Table 5.** *<sup>1</sup>H NMR chemical shifts of the free 4P-hNrf2 peptide in ppm from TSP-d4.* Spectra were recorded at 280 K, pH = 7.2, and 20 mM sodium phosphate buffer; H<sub>2</sub>O:<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, 9:1 (v/v).

Residue	C $\alpha$	C $\beta$	Others
CH <sub>3</sub> CO		23.00	
P333	61.7	31.0	C $\gamma$ 26.1; C $\delta$ 50.3
E334	55.5	29.0	C $\gamma$ 35.1
S335	57.1	62.6	
T336	60.5	68.6	C $\gamma$ 20.4
A337	51.3	18.1	
E338	55.5	28.9	C $\gamma$ 34.9
F339	56.3	38.5	C2 130.7; C3 128.7; C4 130.3
N340	51.8	38.3	
D341	53.0	39.8	
S342	56.8	62.8	
D343	51.8	40.0	
pS344	55.8	64.5	
G345	44.4		
I346	59.7	37.8	C $\gamma$ 16.2, 25.8; C $\delta$ 11.8
pS347	56.3	64.5	
L348	54.4	41.1	C $\gamma$ 25.7; C $\delta$ 22.2, 23.6
N349	51.8	37.7	
T350	60.7	68.4	C $\gamma$ 20.4
S351	55.2	62.3	
P352	60.7	31.7	C $\gamma$ 26.1; C $\delta$ 49.4
S353	57.1	62.3	
V354	60.7	31.7	C $\gamma$ 19.9
A355	51.2	18.1	
S356	55.3	62.3	
P357	62.2	31.0	C $\gamma$ 26.1; C $\delta$ 49.6
E358	55.7	28.9	C $\gamma$ 34.9
H359	54.5	29.2	C2 118.5; C4 *
CONH <sub>2</sub>			

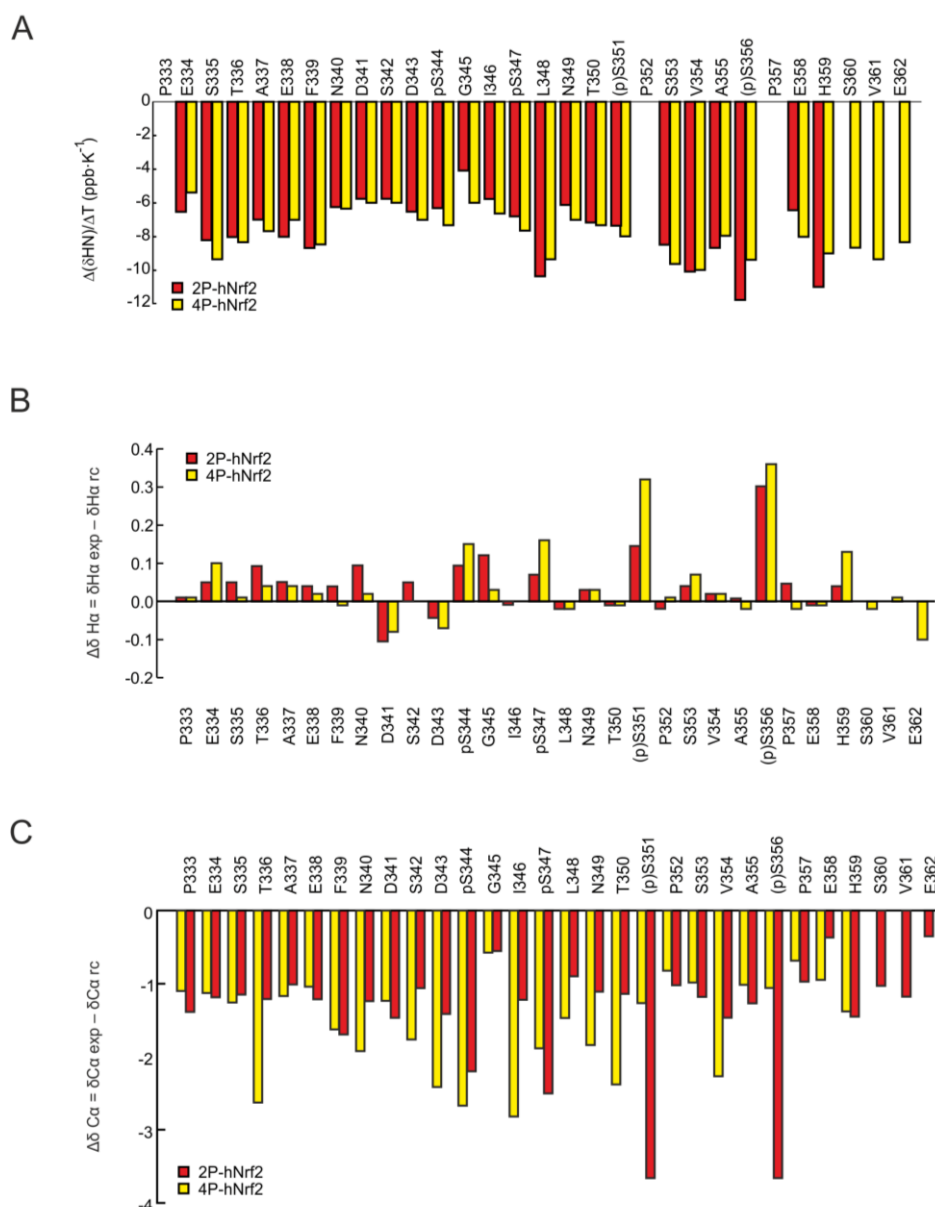
**Table 6.** *<sup>13</sup>C NMR chemical shifts of the free 2P-hNrf2 peptide in ppm from TSP-d4.* Spectra were recorded at 280 K, pH = 7.2, and 20 mM sodium phosphate buffer; H<sub>2</sub>O:<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, 9:1 (v/v). \*Signal not detected.

## RESULTADOS

Residue	C $\alpha$	C $\beta$	Others
CH <sub>3</sub> CO		23.00	
P333	61.02	31.19	C $\gamma$ *; C $\delta$ 47.92
E334	55.25	29.08	C $\gamma$ 33.95
S335	57.00	62.61	
T336	60.52	68.60	C $\gamma$ 20.34
A337	51.35	17.99	
E338	55.21	29.22	C $\gamma$ 33.95
F339	56.29	38.32	C2 130.62; C3 130.19; C4 128.65
N340	51.79	38.99	
D341	52.69	38.95	
S342	57.11	62.63	
D343	52.77	37.64	
pS344	56.43	64.77	
G345	44.17		
I346	59.91	37.58	C $\gamma$ 16.17, 25.96; C $\delta$ 11.82
pS347	55.91	64.77	
L348	55.36	41.08	C $\gamma$ 23.03; C $\delta$ 22.25, 23.58
N349	51.95	37.70	
T350	60.61	68.49	C $\gamma$ 20.34
pS351	53.93	64.88	
P352	62.13	30.85	C $\gamma$ *; C $\delta$ 57.11
S353	57.00	63.70	
V354	60.70	31.42	C $\gamma$ 20.34
A355	51.03	18.06	
pS356	53.93	64.88	
P357	62.19	30.93	C $\gamma$ *; C $\delta$ 49.53
E358	56.23	28.26	C $\gamma$ 33.95
H359	53.71	27.85	C2 135.06; C4 118.95
S360	57.11	62.70	
V361	61.07	31.49	C $\gamma$ 19.89
E362	56.23	29.22	C $\gamma$ 33.95
CONH <sub>2</sub>			

**Table 7.** <sup>13</sup>C NMR chemical shifts of the free 4P-hNrf2 peptide in ppm from TSP-d4. Spectra were recorded at 280 K, pH = 7.2, and 20 mM sodium phosphate buffer; H<sub>2</sub>O:<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, 9:1 (v/v). \*Signal not detected.

Por otra parte, se analizaron los desplazamientos químicos de los protones peptídicos a diferentes temperaturas (280 K, 293 K y 310 K) para eliminar ambigüedades en la asignación de las resonancias más complejas y para evaluar la accesibilidad de los protones en el disolvente. Las variaciones de temperatura pueden provocar un cambio en el medio y por lo tanto, una variación de los desplazamientos químicos de los protones. La amplitud de la perturbación es mayor a medida que los protones son más accesibles al disolvente. Para determinar la influencia de la temperatura sobre cada protón, se calculó el cambio en los desplazamientos químicos de los protones HN para cada residuo (excepto



**Figure 34. Structure analysis of 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2 free in solution.** *A*, Values of the temperature coefficients of the amide proton HN chemical shifts ( $\Delta(\delta\text{HN})/\Delta T$ , ppb·K<sup>-1</sup>) for the 2P-hNrf2 (red bars) and 4P-hNrf2 (yellow bars) peptides at pH 7.2 plotted against the residue number. *B* and *C*, Chemical shift differences between the experimental H $\alpha$  (*B*) and C $\alpha$  (*C*) resonances of 2P-hNrf2 (red bars) and 4P-hNrf2 (yellow bars) and the random coil values defined by Wüthrich (223) and modified by Bienkiewicz (18) for the pSer values. All these chemical shifts were corrected according to Schwarzsinger (190) to consider the nearest-neighbor effects.

## RESULTADOS

para las prolinas, que no tienen protón HN) como una función de la temperatura ( $\Delta(\delta\text{NH})/\Delta T$  (ppb·K<sup>-1</sup>)) (Fig. 34A). Se considera que un protón HN es accesible al disolvente si el valor absoluto de este coeficiente es mayor que 7 ppb·K<sup>-1</sup>. Por el contrario, si el protón observado está implicado en enlaces de hidrógeno o se encuentra escondido en el núcleo estructural del complejo, será menos sensible a los cambios de temperatura, siendo este valor absoluto menor (22). La región que comprende la Asn<sup>340</sup> y la pSer<sup>347</sup>, y particularmente la Gly<sup>345</sup>, presentó los valores absolutos más bajos, entre 4 y 7 ppb·K<sup>-1</sup>, sugiriendo que esta región está parcialmente protegida de las moléculas de agua del disolvente. Además, se observaron patrones similares para los dos péptidos, 2P-hNrf2 y 4P-hNrf2, indicando que ambos poseen estructuras similares.

A partir de los desplazamientos químicos de los protones y de los carbonos <sup>13</sup>C, pudimos obtener más información sobre la estructura secundaria de los péptidos. Para ello, se compararon los desplazamientos químicos experimentales con los desplazamientos teóricos en estructura de *random coil*, definida por Wüthrich (223) y modificada por Bienkiewicz (18) para los residuos de fosfoserina y por Schwarzsinger (190) para considerar el efecto de cada residuo sobre sus vecinos. En este caso, como no existe corrección para los residuos de fosfoserina, se utilizaron los parámetros de una serina estándar. Así, podemos calcular las diferencias de los desplazamientos químicos con las siguientes ecuaciones:

$$\Delta\delta \text{ H}\alpha = \delta\text{H}\alpha \text{ experimental} - \delta\text{H}\alpha \text{ random coil}$$

$$\Delta\delta \text{ C}\alpha = \delta\text{C}\alpha \text{ experimental} - \delta\text{C}\alpha \text{ random coil}$$

Según el valor de  $\Delta\delta$ , podemos deducir la tendencia estructural:

- Si  $\Delta\delta \text{ H}\alpha > 0$ : tendencia a formar una lámina  $\beta$  o un giro.
- Si  $\Delta\delta \text{ H}\alpha < 0$ : tendencia a formar una hélice  $\alpha$ .
- Si  $\Delta\delta \text{ C}\alpha > 0$ : tendencia a formar una hélice  $\alpha$ .
- Si  $\Delta\delta \text{ C}\alpha < 0$ : tendencia a formar una lámina  $\beta$  o un giro.

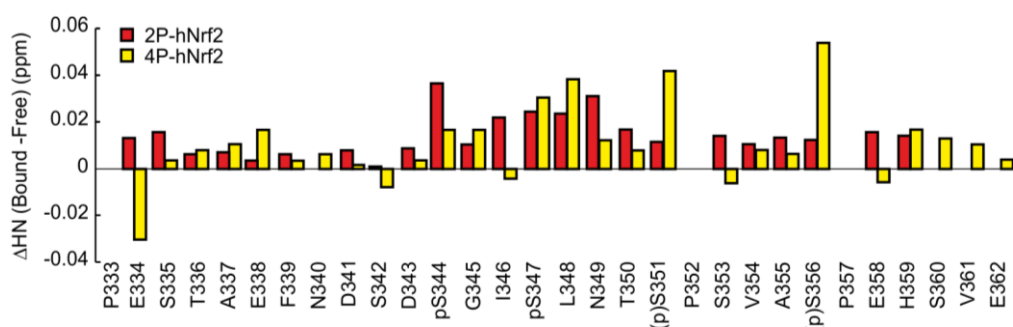
Los valores obtenidos para ambos péptidos (Figs. 24B y C) sugieren que el péptido libre en solución tiende a doblarse formando un codo o una lámina  $\beta$ . La forma de la gráfica correspondiente al  $\Delta\delta \text{ C}\alpha$  mostrando un comportamiento particular de la glicina 345 sugiere preferentemente la presencia de un giro centrado en este residuo. No obstante, estos resultados serán comprobados durante el modelado molecular más adelante.

### 3.3.2 Estudio de la interacción de los péptidos 2P-hNrf2 y 4P-hNrf2 con $\beta$ -TrCP.

Para los experimentos de RMN con  $\beta$ -TrCP, se utilizó una relación 98:1 de péptido a MBP- $\beta$ -TrCP recombinante (1.6 mM 2P-hNrf2 o 4P-hNrf2 y 17  $\mu$ M MBP- $\beta$ -TrCP) a 280 K y a pH 7.2. En primer lugar, hicimos la asignación completa de todos los residuos de ambos péptidos en presencia de  $\beta$ -TrCP siguiendo el mismo protocolo que se ha utilizado anteriormente para los péptidos libres en solución (Tablas 8 y 9). A continuación, para evaluar los cambios de accesibilidad de los protones HN al disolvente, se analizaron las variaciones en los desplazamientos químicos de estos protones en función de la presencia o ausencia de  $\beta$ -TrCP. Los protones en contacto con la proteína se exponen a un entorno diferente y por lo tanto presentan una variación mayor de su desplazamiento químico. Estas variaciones fueron calculadas utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta\text{HN} = \delta\text{HN hNrf2 unido a } \beta\text{-TrCP} - \delta\text{HN hNrf2 libre}$$

Como vemos en la Fig. 35, las variaciones ( $\Delta\text{HN}$ ) más acusadas fueron encontradas en la misma región de ambos péptidos ( $^{344}\text{pSGIpSLN}^{349}$ ) y en las dos pSer $^{351}$  y pSer $^{356}$  adicionales del péptido 4P-hNrf2.



**Figure 35. Chemical shift differences for the HN resonances of 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2.** Difference for the residues of 2P-hNrf2 (red bars) and 4P-hNrf2 (yellow bars) peptides between the chemical shift of a given resonance free in buffer solution and the chemical shift in the presence of the MBP- $\beta$ -TrCP protein plotted against residue number at 280 K and pH 7.2 for HN resonances.

Para confirmar estas observaciones y estudiar más en detalle la interacción entre Nrf2 y  $\beta$ -TrCP, se realizó espectroscopía de Diferencia de Transferencia de Saturación, *Saturation Transfer Difference* (STD). Este tipo de espectroscopía permite detectar la unión transitoria de ligandos (los péptidos de Nrf2) a determinadas macromoléculas ( $\beta$ -TrCP). Este método se basa en la posibilidad de saturar selectivamente los protones de una macromolécula por irradiación específica (Fig. 36A). La frecuencia de la irradiación se establece en un valor donde sólo se encuentran las resonancias de la macromolécula y no las del péptido libre. Como consecuencia de la difusión de espín, la saturación se propaga

## RESULTADOS

Residue	HN	H $\alpha$	H $\beta$	Others
CH <sub>3</sub> CO				CH <sub>3</sub> 2.14
P333		4.43	2.33	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.02; 1.96 CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.68
E334	8.78	4.32	1.98; 2.12	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.33
S335	8.50	4.56	3.92	
T336	8.37	4.40	4.31	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 1.24
A337	8.41	4.32	1.38	
E338	8.46	4.21	1.89	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.10; 2.21
F339	8.38	4.65	3.06; 3.14	H $\delta$ 7.28; H $\epsilon$ 7.32; H $\zeta$ 7.37
N340	8.50	4.74	2.72; 2.82	NH <sub>2</sub> $\gamma$ 7.06; 7.73
D341	8.43	4.62	2.70	
S342	8.33	4.51	3.86; 3.96	
D343	8.56	4.73	2.71; 2.78	
pS344	9.02	4.48	4.08	
G345	8.70	3.94; 4.05		
I346	7.92	4.28	1.93	CH <sub>2</sub> $\gamma$ ; 1.47; 1.21; CH <sub>3</sub> $\gamma$ 0.96; CH <sub>3</sub> $\delta$ 0.90
pS347	8.93	4.54	4.04	
L348	8.74	4.34	1.68	H $\gamma$ 1.61; CH <sub>3</sub> $\delta$ 0.90; 0.95
N349	8.55	4.80	2.87	NH <sub>2</sub> $\gamma$ 7.05; 8.06
T350	8.27	4.36	4.29	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 1.24
S351	8.53	4.78	3.87	
P352		4.50	2.35	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.06; 1.97 CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.75
S353	8.59	4.47	3.88	
V354	8.30	4.18	2.11	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 0.96
A355	8.53	4.36	1.40	
S356	8.55	4.79	3.90	
P357		4.44	2.33	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.05; 1.92 CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.78
E358	8.68	4.19	1.91; 1.96	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.15; 2.25
H359	8.38	4.66	3.13; 3.23	2H $\delta$ 7.13; 1H $\epsilon$ 8.07
CONH <sub>2</sub>				7.27; 7.64

**Table 8. <sup>1</sup>H NMR chemical shifts of the 2P-hNrf2 peptide in presence of  $\beta$ -TrCP, in ppm from TSP-d<sub>4</sub>.** Ratio 2P-hNrf2 peptide: $\beta$ -TrCP protein = 98:1. Spectra were recorded at 280 K, pH = 7.2, and 20 mM sodium phosphate buffer; H<sub>2</sub>O:<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, 9:1 (v/v).



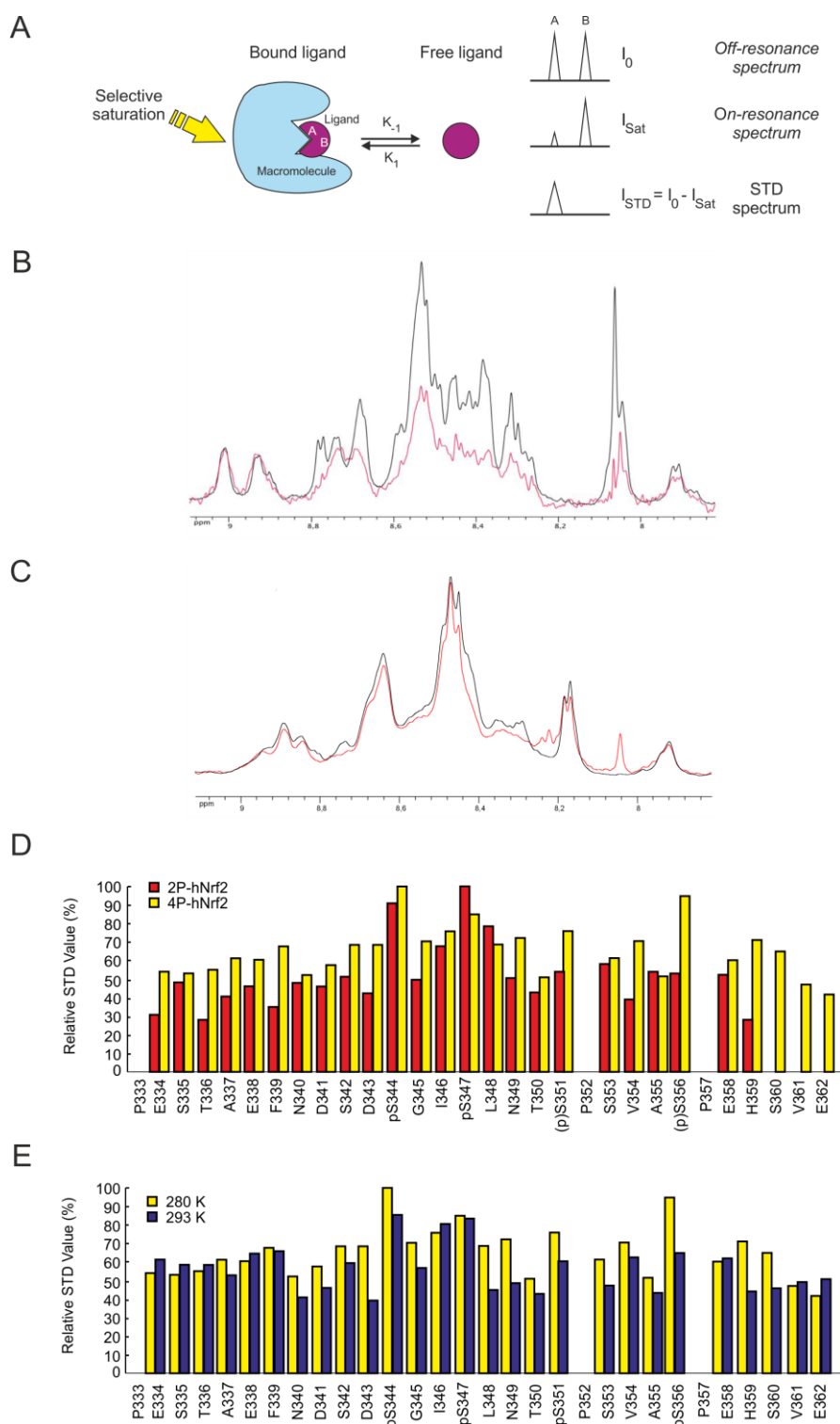
Residue	HN	H $\alpha$	H $\beta$	Others
CH <sub>3</sub> CO				CH <sub>3</sub> *
P333		4.42	2.47	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.05; CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.39
E334	8.81	4.20	1.92; 2.12	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.25
S335	8.74	4.53	3.89	
T336	8.41	4.37	4.24	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 1.19
A337	8.43	4.28	1.36	
E338	8.42	4.20	1.87; 2.04	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.15; 2.23
F339	8.35	4.63	3.02; 3.13	H $\delta$ 7.25; H $\epsilon$ 7.33; H $\zeta$ 7.28
N340	8.49	4.71	2.69; 2.79	NH <sub>2</sub> $\gamma$ 7.05; 7.72
D341	8.43	4.58	2.68	
S342	8.31	4.48	3.83; 3.92	
D343	8.54	4.70	2.69; 2.77	
pS344	8.94	4.46	4.06	
G345	8.67	4.01		
I346	7.92	4.25	1.90	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 1.45; 1.19 CH <sub>3</sub> $\gamma$ 0.92; CH <sub>3</sub> $\delta$ 0.89
pS347	8.91	4.50	4.03	
L348	8.64	4.34	1.63	H $\gamma$ 1.59; CH <sub>3</sub> $\delta$ 0.90; 0.95
N349	8.56	4.80	2.84	NH <sub>2</sub> $\gamma$ 7.11; 7.91
T350	8.28	4.34	4.24	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 1.20
pS351	8.85	4.82	4.04	
P352		4.45	2.30	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.04; CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.86; 3.78
S353	8.50	4.43	3.86	
V354	8.34	4.16	2.08	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 0.87; 0.93
A355	8.49	4.33	1.37	
pS356	8.89	4.76	4.07	
P357		4.38	2.33	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 1.86; CH <sub>2</sub> $\delta$ 3.86
E358	8.63	4.11	1.96; 2.01	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.29; 2.33
H359	8.68	4.74	3.20; 3.23	2H $\delta$ 7.35; 1H $\epsilon$ 8.45
S360	8.65	4.49	3.87	
V361	8.48	4.19	2.14	CH <sub>3</sub> $\gamma$ 0.89; 0.95
E362	8.17	4.12	1.87	CH <sub>2</sub> $\gamma$ 2.03; 2.21
CONH <sub>2</sub>				7.19; 8.29

**Table 9.** *<sup>1</sup>H NMR chemical shifts of the 4P-hNrf2 peptide in presence of  $\beta$ -TrCP, in ppm from TSP-d4.* Ratio 4P-hNrf2 peptide: $\beta$ -TrCP protein = 98:1. Spectra were recorded at 280 K, pH = 7.2, and 20 mM sodium phosphate buffer; H<sub>2</sub>O:<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, 9:1 (v/v). \*Signal not detected.

## RESULTADOS

rápidamente por toda la macromolécula. Esta saturación se transfiere hasta el ligando unido. El resultado es que la intensidad de la señal del ligando se verá atenuada. La sustracción del espectro de referencia sin saturación (espectro desacoplado u *off-resonance*) sobre del espectro saturado (espectro acoplado u *on-resonance*) da lugar al espectro STD, que contiene únicamente las señales de los ligandos unidos.

Mediante esta técnica pudimos determinar qué región de los péptidos está más implicada en la unión con  $\beta$ -TrCP, dado que los grupos que interaccionan más fuertemente presentan un efecto STD mayor. Para los experimentos de STD, utilizamos las siguientes frecuencias de irradiación: -1 ppm para el espectro acoplado (*on-resonance*) y +30 ppm para el espectro desacoplado (*off-resonance*). La irradiación de las señales de la proteína a -1 ppm produjo la saturación completa de  $\beta$ -TrCP por difusión de espines. Esta saturación fue transmitida a los péptidos que se encontraban unidos. Aplicando la segunda irradiación, a +30 ppm, obtuvimos el espectro desacoplado (*off-resonance*) que se restó del espectro acoplado (*on-resonance*). Así se generaron los espectros STD de cada péptido. En las Figs. 26B y C, observamos perfiles espectroscópicos STD a 280 K, que ya nos indican la existencia de interacciones entre  $\beta$ -TrCP y los péptidos de 2P-hNrf2 y 4P-hNrf2. Los valores relativos de STD que se muestran en las Figs. 26D y E se calcularon dividiendo el valor de la intensidad de la señal en el espectro STD entre la intensidad correspondiente de la misma señal en el espectro de referencia  $^1\text{H}$  1D RMN. El valor de STD máximo fue considerado como 100 % y el resto de intensidades fueron normalizadas con este valor. Como se muestra en la Fig. 36D, los protones HN de las pSer<sup>344</sup> y pSer<sup>347</sup> de los péptidos 2P-hNrf2 y 4P-hNrf2 presentaron un valor relativo de STD superior al 80 %, lo cual indica que estos residuos están involucrados en la interacción. Otros residuos de esta región como la Ile<sup>346</sup> y la Leu<sup>348</sup> también mostraron valores cercanos al 80 %, sugiriendo que participan en la unión con  $\beta$ -TrCP a través de interacciones hidrofóbicas. Asimismo, en el caso del péptido tetrafosforilado 4P-hNrf2, los residuos pSer<sup>351</sup> and pSer<sup>356</sup> presentaron intensidades STD en torno al 70 y 90 %, respectivamente. Para determinar la especificidad de estas interacciones, se repitieron los espectros STD del péptido 4P-hNrf2 a 293 K. Con el aumento de la temperatura disminuyeron las intensidades STD, indicando mayor disociación del complejo. Para tener en cuenta esta reducción de la señal y para permitir una mejor comprensión del efecto de la temperatura, se aplicó un factor de corrección de 0.85 sobre las intensidades obtenidas a 293 K (Fig. 36E). Así, las intensidades de los extremos N- y C-terminales del péptido 4P-hNrf2 resultaron muy similares a ambas temperaturas, con valores medios del 50 al 60%. Sin embargo, las intensidades de los residuos situados entre la Asn<sup>340</sup> y la Ser<sup>360</sup> fueron menores a 293 K excepto para los



**Figure 36. Saturation Transfer Difference (STD) NMR experiments of 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2 in the presence of  $\beta$ -TrCP.** **A**, STD spectroscopy allows detecting transient binding of small molecule ligands to macromolecular receptors. Method of STD relies on the possibility to selectively saturate protons of macromolecular receptor by irradiating the spectral region containing "wings" of broad resonances of the macromolecule which is also free of any smaller molecule signals. Due to effective spin diffusion, saturation quickly propagates across the entire macromolecule. If the smaller molecule ligand binds the macromolecule, saturation will also spread onto the ligand. The result will be that intensity of the ligand signal will be attenuated. Substraction of resulting spectrum from the reference spectrum without saturation yields the STD spectrum containing only signals of the binding ligands. STD spectra were recorded with selective saturation of protein resonances with on-resonance irradiation at -1 ppm and off-resonance irradiation at 30 ppm for reference spectra.

## RESULTADOS

residuos pSer<sup>344</sup>, Ile<sup>346</sup> y pSer<sup>347</sup>, que se mantuvieron elevados. Por otro lado, la interacción de los residuos pSer<sup>351</sup> y pSer<sup>356</sup> con  $\beta$ -TrCP fue menos intensa a 293 K. Estos datos indican que las pSer<sup>344</sup> y pSer<sup>347</sup> son necesarias para la interacción con  $\beta$ -TrCP, mientras que las pSer<sup>351</sup> y pSer<sup>356</sup> no parecen ser esenciales, ya que la fuerza de su interacción disminuye al aumentar la temperatura.

### 3.4 Modelado molecular de la interacción Nrf2/ $\beta$ -TrCP.

Dado que la parte de la secuencia del péptido de Nrf2 que está más implicada en la interacción con  $\beta$ -TrCP es la que contiene el dominio <sup>343</sup>DpSGIpSLN<sup>349</sup> se utilizaron los resultados correspondientes al péptido 2P-hNrf2 para el modelado molecular del complejo Nrf2/ $\beta$ -TrCP.

El cálculo de la estructura del péptido 2P-hNrf2 unido a  $\beta$ -TrCP fue realizado utilizando las restricciones de distancia derivadas de los espectros TRNOE (*Transferred Nuclear Overhauser Effect*). Esta técnica es muy efectiva para estudiar las interacciones intramoleculares con ligandos unidos, siempre y cuando el tiempo que permanezca el ligando unido sea considerablemente menor que el tiempo de relajación de los protones y el tiempo de mezcla del experimento NOESY. Para realizar los espectros, se utilizaron unos tiempos de mezcla ( $\tau_m$ ) de 100 y 200 ms a una temperatura de 280 K en presencia de MBP- $\beta$ -TrCP. Mediante el uso del programa CcpNmr se analizaron los espectros TRNOE. Este programa de análisis CcpNmr nos permite visualizar, asignar las resonancias atómicas, analizar posteriormente los parámetros cinéticos de la unión y calcular las restricciones de distancia. No obstante, previo al estudio de los espectros, tuvimos que introducir en el programa varias modificaciones que contemplaran la topología y configuración de la fosfoserina. Sobre los 545 picos del espectro TRNOE registrados, 520 fueron validados para el cálculo. De ellos, 218 picos fueron utilizados para determinar la estructura del péptido asociado a  $\beta$ -TrCP ya que el resto correspondía a picos redundantes. Sobre este total de 218 picos TRNOE, 4 de ellos fueron descartados por no cumplir las restricciones de distancia con átomos vecinos estimadas por el programa. De los 214 restantes, 106 presentaron restricciones ambiguas. Los 108 picos restantes

---

**Figure 36. (Continued) B and C**, One-dimensional <sup>1</sup>H spectrum (black line) and one-dimensional <sup>1</sup>H STD-NMR spectrum (red line) of the 2P-hNrf2 (B) and 4P-hNrf2 (C) peptides in association with the MBP- $\beta$ -TrCP protein. Protons making close contacts with the protein interaction site show significant enhancements of their resonances. **D**, Relative STD intensities for 2P-hNrf2 (red bars) and 4P-hNrf2 (yellow bars) peptides. The integral values of the largest signal for the 2P-hNrf2 peptide (pSer<sup>331</sup> HN proton) and for the 4P-hNrf2 peptide (pSer<sup>328</sup> HN proton) were set to 100 %. The relative degree of saturation for the individual protons normalized to the largest signal was used to compare the STD effect. **E**, Effect of temperature (280 K or 293 K) on the relative STD intensities for 4P-hNrf2. The integral value of the largest signal of the 4P-Nrf2 (pSer<sup>328</sup> HN proton) was set to 100% at 280 K. A correction factor of 0.85 was applied on STD values obtained at 293 K.

mostraron restricciones no ambiguas. Estos picos fueron utilizados para el modelado.

Estos datos generados por el programa CcpNmr fueron importados en el programa de cálculo de estructura ARIA2.3 (*Ambiguous Restraints for Iterative Assignment*). Este programa permite calcular estructuras tridimensionales basándose en un proceso iterativo de asignación de resonancias. El programa realiza 8 iteraciones hasta generar la estructura final. En cada iteración, ARIA reduce la ambigüedad en picos NOE, detecta la existencia de picos inconsistentes y genera una familia de estructuras compatibles con las restricciones experimentales. El programa recalibra los picos NOE según las restricciones de distancia configuradas y hace el análisis estadístico de las violaciones de las restricciones, de manera que en cada iteración elimina las asignaciones menos probables y genera una estructura cada vez más refinada. En la iteración final, se generaron 50 estructuras de baja energía para el péptido 2P-hNrf2. Este conjunto fue seleccionado considerando la geometría correcta y la ausencia de violaciones de restricción de distancia mayores a 0.5 Å. La superposición sobre el motivo DpSGIpS de las cinco configuraciones de menor energía se muestran en la Fig. 37A. La presencia de las serinas fosforiladas en el péptido indujo una conformación en giro o codo también encontrado en otros sustratos de  $\beta$ -TrCP. Para analizar la precisión de modelo, se calcularon los valores RMSD (*root-mean-square deviation*) para los enlaces de la cadena peptídica del motivo DpSGIpS. Este coeficiente es una medida del grado de similitud/dispersión entre las estructuras generadas, siendo menor cuánto mejor superponen sus esqueletos peptídicos. El coeficiente RMSD para los enlaces de la cadena peptídica del motivo DpSGIpS en la familia de 50 estructuras es  $1.2 \pm 0.6$  Å.

El modelo del complejo 2P-hNrf2/ $\beta$ -TrCP fue creado mediante cálculos de *docking* o acoplamiento molecular a partir de las estructuras de baja energía obtenidas de los experimentos de espectroscopía TRNOE. Para modelar el péptido acoplado a  $\beta$ -TrCP se utilizó el programa Surflex-Dock, un algoritmo de acoplamiento molecular automático y flexible. Debido al alto grado de flexibilidad del programa, los cálculos con Surflex-Dock fueron limitados a los 10 residuos centrados en el dominio de interacción <sup>341</sup>DSDpSGIpSLNT<sup>350</sup>. Como punto de partida, para la estructura de  $\beta$ -TrCP se utilizó su estructura tridimensional previamente descrita para el cristal de su complejo con un péptido de 10 residuos de  $\beta$ -catenina (Código PDB 1P22) (222) (Fig. 37B). Obtuvimos 32 estructuras de acoplamiento entre  $\beta$ -TrCP y el péptido de hNrf2. La estructura de menor energía generada para la secuencia DSDpSGIpSLNT fue superpuesta sobre la estructura de menor energía obtenida a partir de los espectros TRNOE (Fig. 37C). Los valores RMSD fueron  $1.9 \pm 0.6$  Å considerando el fragmento de secuencia DSDpSGIpSLNT, y  $1.1 \pm 0.4$  Å

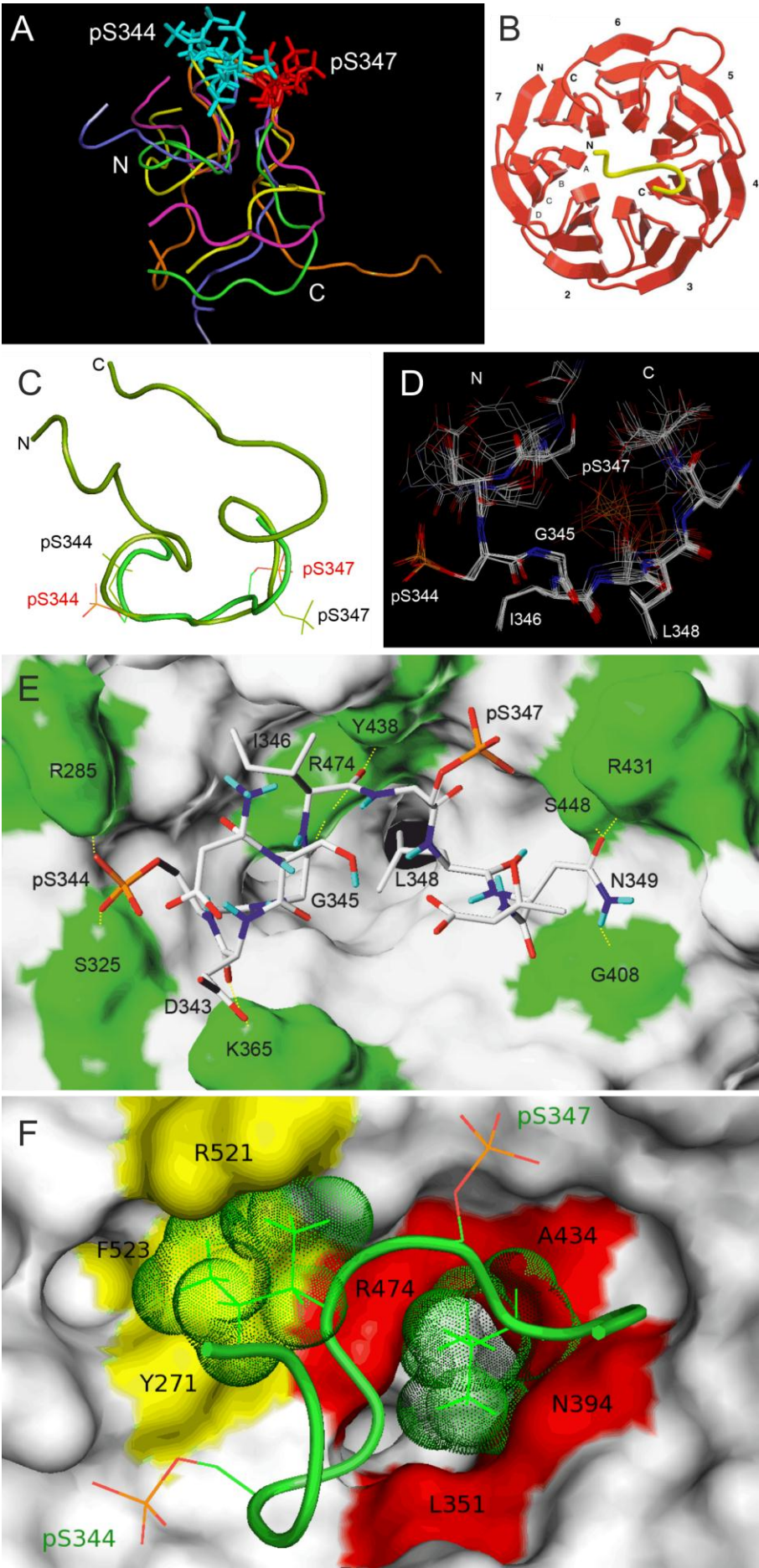
## RESULTADOS

para el fragmento DpSGIpS. Como se observa en la Fig. 37C, el giro o codo se conservó en ambas estructuras, aunque la posición del grupo fosfato cambia. Al contrario que en la estructura derivada de los espectros TRNOE, encontramos que los grupos fosfato de las pSer<sup>344</sup> y pSer<sup>347</sup> adoptaron una conformación de menor energía en la estructura generada por acoplamiento, promoviendo una optimización de la interacción con la superficie de  $\beta$ -TrCP. De las 32 estructuras creadas, la Fig. 37D muestra la superposición de las 7 conformaciones con puntuaciones más bajas en base a criterios energéticos. Entre ellas se observó un buen ajuste del fragmento pSGI y de la Leu<sup>348</sup> mientras que la cadena lateral de la pSer<sup>347</sup> fue más flexible. Los coeficientes RMSD para los enlaces de la cadena peptídica del motivo DpSGIpS y de la secuencia completa con los diez residuos fueron  $0.4 \pm 0.2$  Å y  $0.9 \pm 0.5$  Å, respectivamente. La estructura con menor energía del complejo se muestra en modelo de Dreiding en las Figs. 37E y F. En la Fig. 37E, los aminoácidos de  $\beta$ -TrCP que participan en la formación de puentes de hidrógeno con Nrf2 están coloreados en verde, mientras que los puentes de hidrógeno aparecen marcados con líneas discontinuas amarillas. Siete de los diez puentes de hidrógeno implican al dominio DpSGI y los tres restantes están relacionados con la Asn<sup>349</sup>. El grupo carbonilo y el grupo carboxilo del Asp<sup>343</sup> forman dos enlaces de hidrógeno con el grupo  $\zeta$ NH<sub>2</sub> de la Lys<sup>365</sup> de  $\beta$ -TrCP. El grupo fosfato de la Ser<sup>344</sup> forma dos puentes de hidrógeno con el grupo  $\epsilon$ NH de la Arg<sup>285</sup> y el grupo hidroxilo de la Ser<sup>325</sup> de  $\beta$ -TrCP. El grupo carbonilo de la Gly<sup>345</sup> forma un enlace de hidrógeno el grupo  $\epsilon$ NH de la Arg<sup>474</sup> de  $\beta$ -TrCP. El grupo carbonilo de la Ile<sup>346</sup> forma un puente de hidrógeno con el grupo  $\epsilon$ NH of Arg<sup>474</sup> y el grupo OH de la Tyr<sup>438</sup> de  $\beta$ -TrCP. El grupo  $\gamma$ -carbonilo de la Asn<sup>349</sup> forma un enlace de hidrógeno con el grupo  $\epsilon$ NH de Arg<sup>431</sup> y el grupo hidroxilo de la Ser<sup>448</sup> de  $\beta$ -TrCP. Finalmente, el grupo  $\gamma$ NH<sub>2</sub> de la Asn<sup>349</sup> forma un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo de la Gly<sup>408</sup> de  $\beta$ -TrCP. Es posible que la pSer<sup>347</sup> establezca enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas con los grupos  $\epsilon$ NH de las Arg<sup>521</sup> o Arg<sup>431</sup> de  $\beta$ -TrCP, sin embargo, estos contactos no fueron encontrados en la configuración de energía más baja.

---

**Figure 37. TRNOE-derived structures of the 2P-hNrf2 peptide bound to  $\beta$ -TrCP and analysis of the docking interactions.** **A**, Among 50 TRNOEs derived structures, the five lowest energy conformations are shown. Superimpositions are shown on the DpSGIpS motif. **B**, Crystal structure of the complex of  $\beta$ -TrCP with  $\beta$ -catenin (PDB ID code 1P22). **C**, Nrf2 docked structure (light green) superimposed with the TRNOE bound structure (dark green) on the DpSGIpS motif. Phosphoserine residues are labelled in red in the docked structure and black in the TRNOE structure. **D**, Seven lowest score poses that are representative of the bound structures of Nrf2. The superimposition was made on the DpSGIpS motif. **E**, Structure of the complex of  $\beta$ -TrCP with the best docking pose of Nrf2 deduced from the NMR data.  $\beta$ -TrCP is shown in surface representation. Amino acids of  $\beta$ -TrCP and Nrf2 that participate in intermolecular interactions are shown in black and white letters, respectively. H-bonds are shown with dashed yellow lines. **F**, Amino acids of  $\beta$ -TrCP that participate in hydrophobic interactions with Nrf2 are shown in black letters. The hydrophobic cluster in red surface, located at the entrance of the central channel of  $\beta$ -TrCP, interacts with the side chain of Leu<sup>348</sup> shown in green dots surface. The hydrophobic cluster in yellow surface interacts with the side chain of Ile<sup>346</sup> shown in green dots surface.





## RESULTADOS

Además de los enlaces de hidrógeno, se observaron varios contactos de carácter hidrofóbico (Fig. 37F). La cadena lateral de la Ile<sup>346</sup> se encuentra estabilizada en el bolsillo hidrofóbico formado por los anillos aromáticos de la Phe<sup>523</sup> y de la Tyr<sup>271</sup> y el grupo guanidinio de la Arg<sup>521</sup> de  $\beta$ -TrCP (coloreados en amarillo). La cadena lateral de la Leu<sup>348</sup> se estabiliza en el canal hidrofóbico central contactando con la Leu<sup>351</sup>, la Asn<sup>394</sup>, la Ala<sup>434</sup> y la Arg<sup>474</sup> del dominio WD40 de  $\beta$ -TrCP (coloreados en rojo).

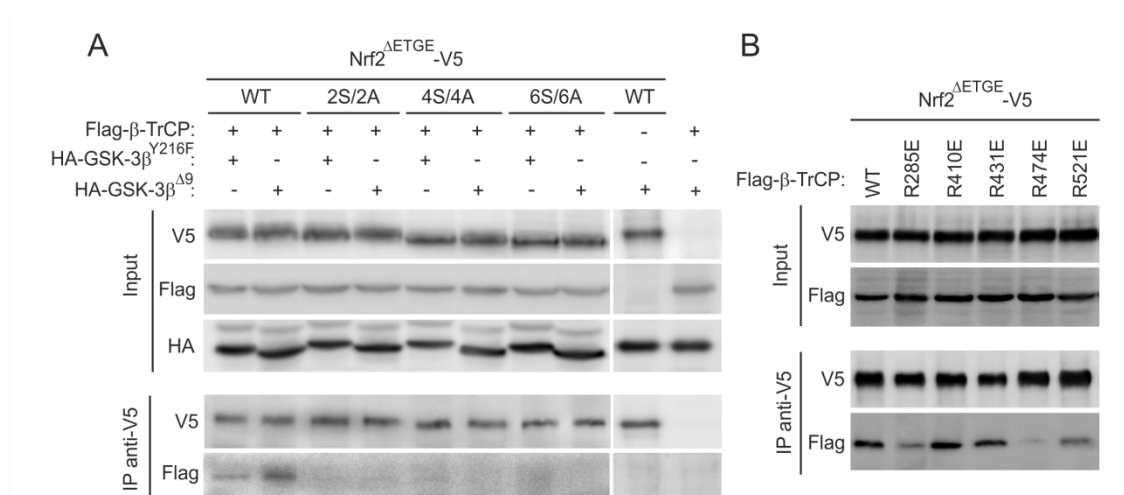
En conjunto, todos estos contactos parecen ser esenciales para la unión entre Nrf2 y  $\beta$ -TrCP y explican la gran estabilidad del complejo 2P-hNrf2/ $\beta$ -TrCP.

### **3.5 Los residuos de serina localizados en el motivo DSGIS del dominio Neh6 son necesarios para la interacción entre Nrf2 y $\beta$ -TrCP.**

La contribución de cada una de las seis serinas del dominio Neh6 en la asociación entre Nrf2 y  $\beta$ -TrCP fue analizada mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. Las células HEK293T fueron co-transfectadas con vectores de expresión para Flag- $\beta$ -TrCP y con HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup> o HA-GSK-3 $\beta$ <sup>A9</sup>. Además, fueron co-transfectadas con mNrf2-V5 con el dominio Neh6 intacto (silvestre) o con las mutaciones puntuales Ser a Ala en las posiciones 335 y 338 (2S/2A), 335, 338, 342 y 347 (4S/4A) o 335, 338, 342, 347, 351 y 355 (6S/6A) de Nrf2 murino, como se indica en la Fig. 38A. Las células fueron deprivadas de suero durante 16 h y tratadas con el inhibidor del proteasoma, MG132 (40  $\mu$ M) durante las 3 h últimas de incubación. Como ya se mostró con anterioridad, Nrf2 silvestre se asoció con  $\beta$ -TrCP y esta asociación aumentó en presencia de GSK-3 $\beta$ <sup>A9</sup>. Sin embargo, la introducción de las mutaciones puntuales a alanina de los residuos Ser<sup>335</sup> y Ser<sup>338</sup> fue suficiente para eliminar por completo esta interacción. Estos datos muestran que estos residuos son esenciales para la interacción con  $\beta$ -TrCP, confirmando *in vivo* los resultados obtenidos por RMN.

Por otra parte, analizamos la participación de ciertos residuos de arginina del dominio WD40 de  $\beta$ -TrCP en la asociación con Nrf2. Introdujimos varias mutaciones puntuales de las Arg<sup>285</sup>, Arg<sup>410</sup>, Arg<sup>431</sup>, Arg<sup>474</sup> y Arg<sup>521</sup> de  $\beta$ -TrCP a Glu (235). Las células HEK293T fueron co-transfectadas con  $\beta$ -TrCP silvestre o con las versiones mutadas en las argininas junto con Nrf2-V5, deprivadas de suero durante 16 h y mantenidas con MG132 (40  $\mu$ M) durante las 3 h finales. Los experimentos de asociación (Fig. 38B) mostraron que las argininas Arg<sup>285</sup>, Arg<sup>474</sup> y Arg<sup>521</sup> de  $\beta$ -TrCP son esenciales en la interacción con Nrf2, mientras que las argininas Arg<sup>410</sup> y Arg<sup>431</sup> no estaban implicadas. Estos resultados obtenidos en células son consistentes con el modelo de interacción descrito por RMN.





**Figure 38. Identification of critical residues for Nrf2 docking onto β-TrCP by pull-down assays.** **A**, HEK293T cells were co-transfected with Flag-tagged β-TrCP, HA-tagged GSK-3β<sup>Y216F</sup> and GSK-3β<sup>Δ9</sup>, as indicated, plus V5-tagged mouse Nrf2<sup>ΔETGE</sup> with either a wild-type Neh6 domain (wt) or mutations of Ser<sup>335</sup> and Ser<sup>338</sup> to Ala (2S/2A), or Ser<sup>335</sup>, Ser<sup>338</sup>, Ser<sup>342</sup> and Ser<sup>347</sup> to Ala (4S/4A), or Ser<sup>335</sup>, Ser<sup>338</sup>, Ser<sup>342</sup>, Ser<sup>347</sup>, Ser<sup>351</sup> and Ser<sup>355</sup> to Ala (6S/6A). Cells were maintained in low serum for 16 h and treated with 40 μM MG132 for the last 3 h before pull-down of protein complexes with anti-V5 antibodies. **B**, HEK293T cells were co-transfected with V5-tagged Nrf2<sup>ΔETGE</sup> and Flag-tagged β-TrCP with either a wild-type WD40 domain or single point mutations of Arg to Glu at the indicated residues. Cells were maintained in low serum for 16 h and treated with 40 μM MG132 for the last 3 h before the pull-down assay was performed.

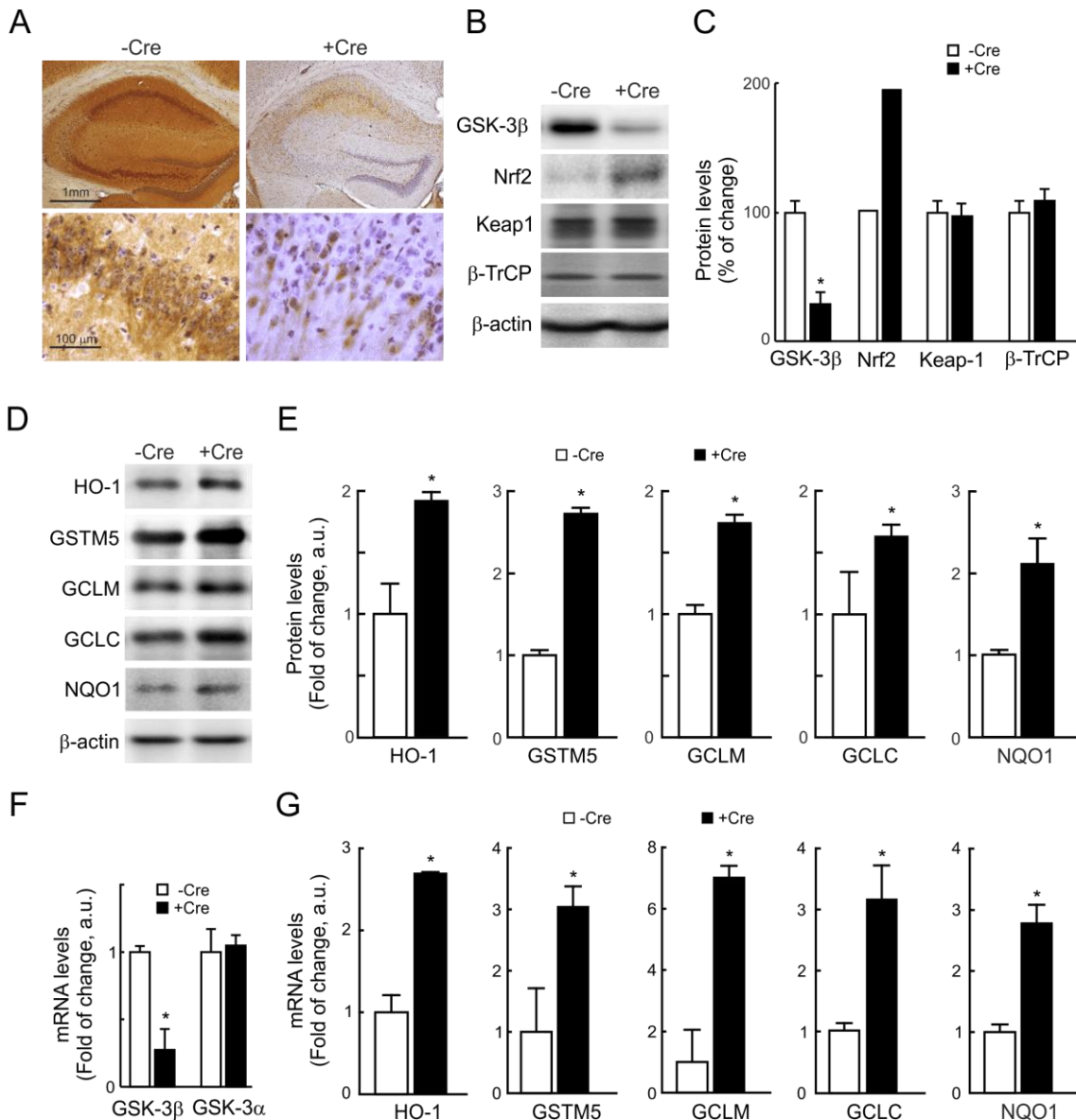
## 4 Relevancia funcional de la regulación de Nrf2 por GSK-3.

### 4.1 Regulación de Nrf2 en ratones con una depleción condicional de GSK-3β en neuronas.

Con el objetivo de determinar la relevancia del mecanismo de degradación modulada por GSK-3/β-TrCP sobre la estabilidad de Nrf2 *in vivo*, analizamos la función de Nrf2 en hipocampos de ratones transgénicos con una depleción condicional de GSK-3β específica de neuronas (denominada +Cre). Ensayos de inmunohistoquímica e inmunoblots revelaron una fuerte reducción en los niveles de GSK-3β en los ratones +Cre comparados con los ratones control (-Cre) (Figs. 39A y B). La determinación cuantitativa de los niveles de RNA mensajero indicó una reducción de la expresión de GSK-3β de aproximadamente el 80 % en comparación con los ratones control, mientras que los niveles de RNA mensajero de GSK-3α permanecieron constantes (Fig. 39F). Esta disminución a nivel de RNA correlacionó con una reducción de los niveles proteicos de GSK-3β del 75 % (Figs. 39B y C). Sin embargo, los niveles de las E3 ligasas que gobiernan la degradación de Nrf2, Keap1 y β-TrCP, no cambiaron (Figs. 39B y C). Es muy importante destacar que *in vivo* también obtuvimos un incremento de los niveles proteicos de Nrf2 sólo en los ratones +Cre (Figs. 39B y C). A continuación, estudiamos los niveles de proteína

## RESULTADOS

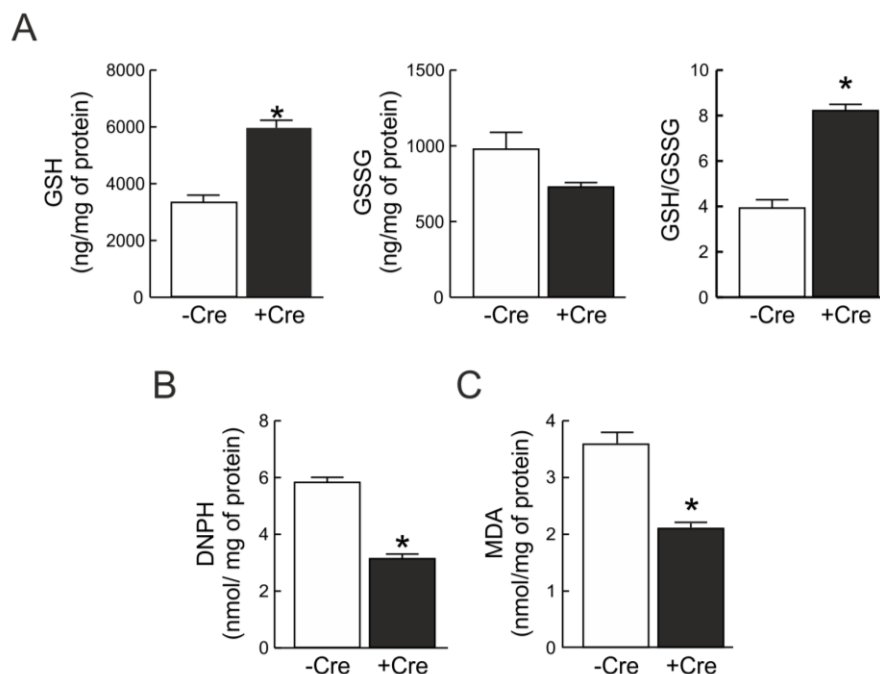
y de RNA mensajero de algunas enzimas reguladas por Nrf2. Como se muestra en las Figs. 39D, E y G, tanto los niveles de proteína como de RNA mensajero de las enzimas HO-1, GSTM5, GCLM, GCLC y NQO1 estaban incrementados en los hipocampos de los ratones +Cre en comparación con los controles. Estos resultados muestran que la disrupción de la



**Figure 39. GSK-3β deficiency results in increased expression of Nrf2-target genes. A,** Immunohistochemistry of 30-μm-thick hippocampal sections from control mice (-Cre) with normal GSK-3β levels and in neuron-specific GSK-3β knockout mice (+Cre). Upper panels, anti-GSK-3β antibody staining and Nissl counterstaining. Lower panels, higher magnification of the CA1 region of hippocampus. **B,** Immunoblots showing protein levels of GSK-3β, Nrf2, Keap1, β-TrCP and β-actin. **C,** Densitometric quantification of protein levels from representative blots like those of **B** normalized with β-actin levels. **D,** Immunoblots showing protein levels of five enzymes whose expression is regulated by Nrf2 (heme oxygenase-1, HO-1; glutathione S-transferase M5, GSTM5; γ-glutamyl cysteine ligase modulatory subunit, GCLM; γ-glutamyl cysteine ligase catalytic subunit, GCLC). **E,** Densitometric quantification of protein levels from representative blots like those of **D**. **F,** Messenger RNA levels in hippocampus of GSK-3β and GSK-3α in control mice and in neuron specific GSK-3β knockout mice, determined by quantitative RT-PCR. **G,** Messenger RNA levels of HO-1, GSTM5, GCLM, GCLC and NQO1, by RT-PCR. For **C, E, F** and **G**, values correspond to the mean ± SEM of n=6 animals per group. Student's t test was applied to determine the significance of biochemical differences among groups. Asterisks denote significant differences between genotypes with \*p<0.05.

vía de degradación mediada por GSK-3/ $\beta$ -TrCP tiene como consecuencia un incremento de Nrf2 y de sus genes diana *in vivo*.

Considerando que los ratones con deficiencia condicional de GSK-3 $\beta$  en neuronas presentan niveles elevados de Nrf2 y una respuesta de fase II aumentada, analizamos si este incremento tenía una relevancia funcional. En primer lugar medimos los niveles de glutatión como indicador de la capacidad antioxidante, dado que las enzimas encargadas del metabolismo del glutatión están reguladas por Nrf2. Como se observa en la Fig. 40A, en los ratones +Cre los niveles de glutatión reducido (GSH) se incrementaron con respecto a los animales control. Asimismo, los niveles de glutatión oxidado (GSSG) fueron menores que los ratones +Cre, siendo la relación GSH/GSSG mayor en estos ratones. Este aumento de los niveles de GSH en los ratones +Cre está estrechamente relacionado con los niveles de Nrf2. A continuación, también examinamos los niveles basales de proteínas carboniladas y de peroxidación de lípidos como reflejo de la actividad antioxidante. Como se muestra en las Figs. 40 B y C, la deficiencia en GSK-3 supone una reducción significativa de los niveles de proteínas carboniladas y de lípidos peroxidados. En conjunto, estos datos nos indican que GSK-3 $\beta$  también modula los niveles de Nrf2 en hipocampo teniendo como resultado una mayor capacidad antioxidante.

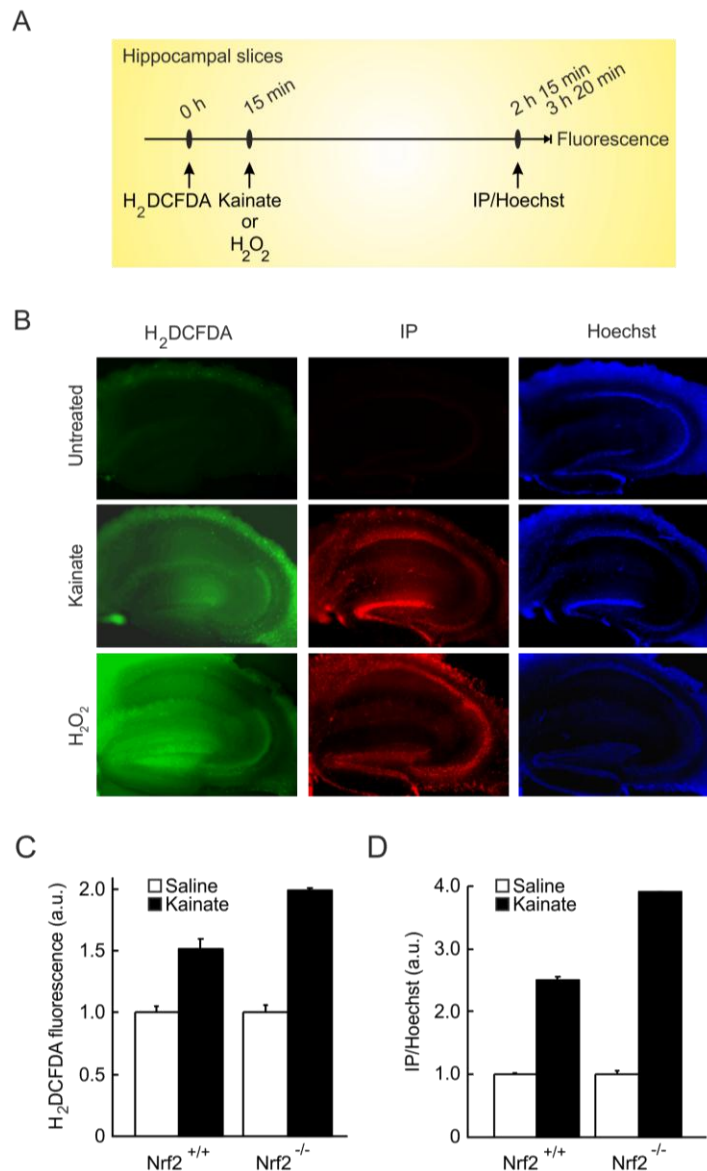


**Figure 40. GSK-3 $\beta$  deficiency results in an enhanced antioxidant activity.** **A**, Left and middle panels, GSH and GSSG levels in the hippocampus of mice with conditional depletion of GSK-3 $\beta$  (+Cre) and control mice (-Cre). Right panel, GSH/GSSG ratio. **B**, Levels of carbonylated proteins levels in the hippocampus of +Cre and -Cre mice. 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) was used to qualitatively detect carbonyl groups associated with proteins. **C**, Levels of MDA as a quantification of lipid peroxidation in the hippocampus of +Cre and -Cre mice. For A-C, values correspond to the mean  $\pm$  SEM of n=3 animals per group. Student's t test was applied to determine the significance of biochemical differences among groups. Asterisks denote significant differences between genotypes with \*p<0.05.

## RESULTADOS

### 4.2 Regulación de Nrf2 por GSK-3 en un modelo de excitotoxicidad inducida por kainato.

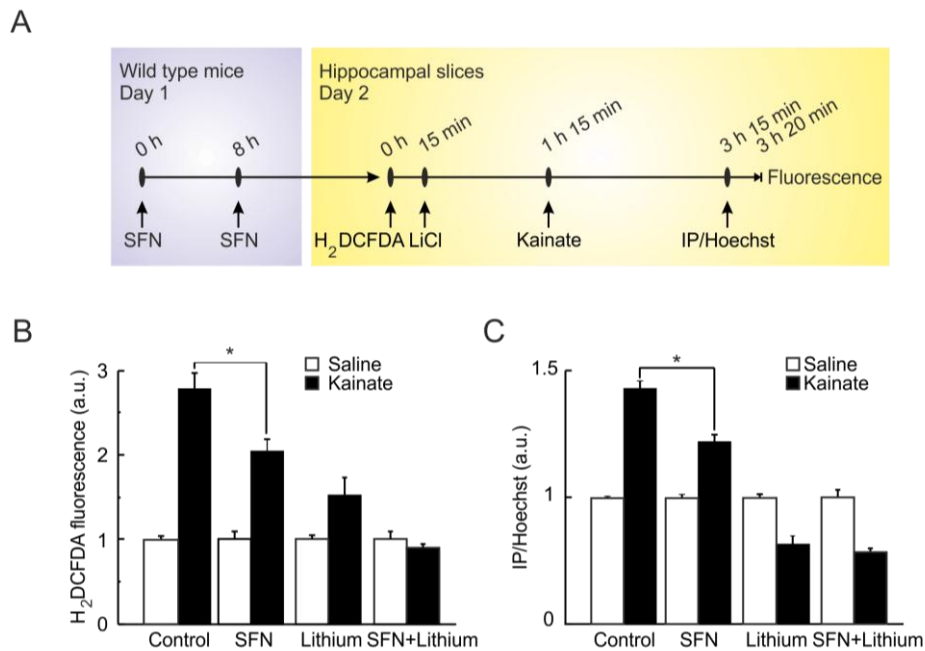
En primer lugar, analizamos la generación de ROS y la muerte celular inducida por kainato en secciones de hipocampo de 200  $\mu\text{m}$  de grosor procedentes de animales silvestres o deficientes en Nrf2. La medición de ROS fue realizada mediante fluorescencia directa con la sonda 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ). En presencia de ROS, esta sonda se oxida a 2,7-diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescencia verde



**Figure 41. Nrf2 null mice exhibit exacerbated sensibility to kainate-induced hippocampal damage.** *A*, Experimental protocol of kainate or  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatments. 200  $\mu\text{m}$  thick hippocampal slices were pre-incubated for 15 min with the redox sensitive probe  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (100  $\mu\text{M}$ ) and then submitted to 500  $\mu\text{M}$  kainate or 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 2 h. During the last 5 min slices were also submitted to PI (1 mg/ml) to detect dead cells and Hoechst 33342 (1 mg/ml) to visualize all nuclei. *B*, Representative images from hippocampal slices treated as described in *A*. *C* and *D*, Densitometric quantification of  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  and PI fluorescence in hippocampal slices from wild type and Nrf2 knockout mice. PI fluorescence values were normalized with Hoechst levels.

(142). También analizamos el grado de muerte celular mediante tinción de ácidos nucleicos con yoduro de propidio (IP). Este compuesto se acumula en el núcleo de células muertas, emitiendo fluorescencia roja. Las secciones de hipocampo fueron incubadas con H<sub>2</sub>DCFDA (100  $\mu$ M, 15 min), después con kainato (500  $\mu$ M, 2h) o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como control (2 mM, 2 h) y finalmente, con IP (1 mg/ml, 5 min) (Fig. 41A). Las secciones fueron contrateñidas con Hoestch 33342 (1 mg/ml) añadido al mismo tiempo que el IP, para visualizar los núcleos. Como se muestra en la Fig. 41B, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el kainato indujeron un incremento significativo en la fluorescencia de H<sub>2</sub>DCFDA, especialmente en CA3 y en el giro dentado. También aumentó la fluorescencia del IP indicando que los tratamientos inducen muerte neuronal. Como se muestra en las cuantificaciones de las Figs. 41B y C, en las secciones de hipocampos procedentes de ratones silvestres el kainato produjo un leve incremento de fluorescencia de H<sub>2</sub>DCFDA y de IP. Sin embargo, las secciones procedentes de ratones Nrf2<sup>-/-</sup> fueron más sensibles al daño producido por kainato presentando valores más altos de fluorescencia de H<sub>2</sub>DCFDA y de IP. Estos resultados indican que Nrf2 atenúa el daño oxidativo y muerte celular inducida por kainato en el hipocampo.

A continuación, determinamos si el bloqueo de las dos vías de degradación de Nrf2, dependientes de su dominios Neh2 y Neh6, podrían conducir a una mayor protección frente a daño excitotóxico generado por kainato. Empleamos SFN y litio para bloquear la interacción Neh2/Keap1 y Neh6/GSK-3/ $\beta$ -TrCP, respectivamente. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con SFN (50 mg/kg) o con suero salino dos veces separadas 8 h como se muestra en la Fig. 42A. Después, se obtuvieron las secciones de hipocampo y se pre-incubaron con H<sub>2</sub>DCFDA (100  $\mu$ M, 15 min) y con LiCl (10 mM) durante 1 h más. A continuación, las secciones fueron tratadas con kainato (500  $\mu$ M, 2 h), y después con yoduro de propidio (IP) (1 mg/ml, 5 min) y con Hoestch 33342 (1 mg/ml). Como se muestra en la Fig. 42B, el SFN provocó una reducción moderada de la fluorescencia generada por la presencia de kainato. A su vez, el litio también provocó una disminución de los niveles de ROS. Sin embargo, el co-tratamiento con ambos compuestos produjo una reducción mayor, hasta niveles de fluorescencia similares a los cultivos control sin tratar con kainato. En cuanto a la muerte celular (Fig. 42C), el SFN produjo una reducción significativa en la tinción de IP. Además, el litio promovió una drástica reducción por sí solo hasta niveles basales. De nuevo, la combinación de litio con SFN fue el tratamiento más eficiente. Estas observaciones nos indican que Nrf2 puede ser regulado *in vivo* no sólo a través de la vía clásica de Keap1 sino también a través de la modulación de la ruta GSK-3/ $\beta$ -TrCP, situando a GSK-3 como una nueva diana terapéutica en enfermedades relacionadas con estrés oxidativo.



**Figure 42. SFN combined with lithium ameliorated kainate-induced ROS production and cell death in hippocampus.** **A**, Experimental protocol of SFN and lithium administration. One day before dissection of hippocampi animals received two intraperitoneal injections of SFN (50 mg/kg) or saline separated 8 h from each other. The slices were pretreated with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA for 15 min, pre-incubated or not with 10 mM LiCl during 1 h and challenged with 500  $\mu$ M kainate for 2 h. Then, the slices were also submitted to a last 5 min incubation with PI (1 mg/ml) and Hoechst (1 mg/ml) to detect dead cells and total cells respectively. **B** and **C**, Densitometric quantification of H<sub>2</sub>DCFDA and PI fluorescence in hippocampal slices. Fluorescent density obtained with PI was normalized by the fluorescent density obtained with Hoechst. Values are the mean of three samples. Bars indicate standard deviation. Similar results were obtained in three independent experiments.

## ***DISCUSIÓN***





## Discusión

---

Considerando que Nrf2 participa en múltiples aspectos de la fisiología celular, es esencial que su actividad se encuentre estrictamente controlada. A lo largo de esta Tesis hemos descrito una nueva vía de degradación de Nrf2 que es modulada por la quinasa GSK-3 y el complejo de degradación SCF/ $\beta$ -TrCP.

### 1 Modelo de degradación dual de Nrf2 mediado por GSK-3/ $\beta$ -TrCP y Keap1.

Durante los últimos años, se han desarrollado dos líneas de investigación para explicar los mecanismos moleculares involucrados en la activación de Nrf2 por compuestos endobióticos y xenobióticos. El primero de ellos se centra en la degradación de Nrf2 a través de Keap1, y el segundo, en la fosforilación de Nrf2. Mientras que el papel de Keap1 ha sido estudiado en detalle proporcionando una explicación de la respuesta celular frente a compuestos electrofílicos y oxidantes, la regulación de Nrf2 por fosforilación aún continúa sin caracterizarse a fondo.

Dado que los genes de fase II protegen a las células frente a situaciones de estrés oxidativo, hemos examinado la posible conexión entre la regulación de estos genes y la vía canónica de supervivencia representada por PI3K y su efector Akt. Trabajos previos del grupo del Dr. Cuadrado describen un incremento en la regulación de la enzima prototipo de fase II, hemo oxigenasa 1 (HO-1) en respuesta al factor de crecimiento nervioso (NGF) (185) y al fitoquímico carnosol (140) por un mecanismo que requiere la activación de PI3K/Akt. Sin embargo, ninguno de los componentes de la vía clásica de regulación de Nrf2, como son MafG, MafK, Keap1, y Bach1 son fosforilados por Akt. Analizando las proteínas reguladas por Akt, nos centramos en GSK-3 ya que su activación hace que las células sean más sensibles frente a estrés oxidativo y a apoptosis. En los últimos años, en el grupo del Dr. Cuadrado se ha estudiado la modulación de Nrf2 por GSK-3 estableciendo dos niveles de regulación, por un lado, a través su localización subcelular promoviendo su exclusión del núcleo (184) y por otro lado, a través del control de su estabilidad, siendo éste el tema central de esta Tesis Doctoral.

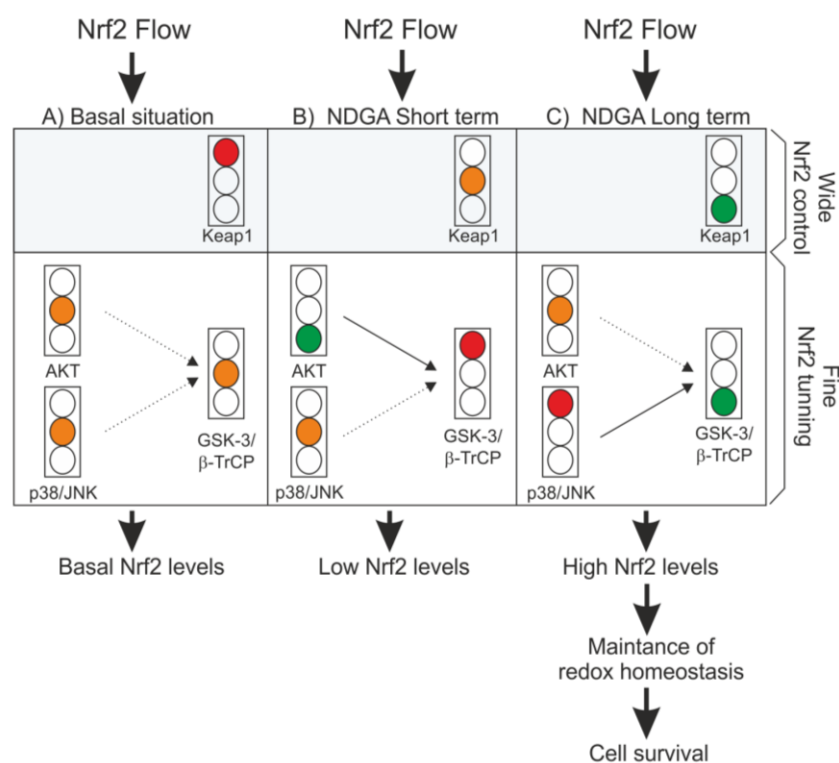
En primer lugar, determinamos el efecto de la inhibición farmacológica de GSK-3 sobre la estabilidad de Nrf2. Para este fin hemos utilizado varios inhibidores de GSK-3, como son el SB216763 (IC<sub>50</sub> 7-34 nM), el litio (IC<sub>50</sub> 1-2 mM), el TDZD-8 (IC<sub>50</sub> 2  $\mu$ M) y el CT99021 (IC<sub>50</sub> 10 nM). Es importante destacar que a pesar de que estos inhibidores regulan de manera distinta a GSK-3, en todos los casos su inhibición correlaciona con un

## DISCUSIÓN

incremento de los niveles proteicos de Nrf2 y un aumento de su actividad transcripcional. Estos resultados han sido verificados utilizando modelos celulares de naturaleza variada como son los fibroblastos embrionarios de ratones silvestres y deficientes en Keap1, las células humanas de riñón HEK293T y las células de origen neuronal N2A de ratón. Bajo las mismas condiciones experimentales observamos que estos inhibidores cooperan con los inductores clásicos, tBHQ y SFN, provocando una inducción aún mayor de Nrf2. Gracias al uso de los fibroblastos embrionarios deficientes en Keap1 y a una versión de Nrf2 insensible a esta E3 ligasa, Nrf2<sup>ΔETGE-V5</sup>, concluimos que el aumento de la cantidad de Nrf2 debido a la inhibición de GSK-3 es independiente de la presencia de Keap1. GSK-3 presenta dos isoformas, GSK-3 $\alpha$  y GSK-3 $\beta$ , que podrían estar implicadas en la regulación de Nrf2. Teniendo en cuenta que los inhibidores anteriormente mencionados no son específicos para cada una de estas isoformas, utilizamos siRNAs contra cada una de ellas y así verificamos que ambas isoformas regulan los niveles de Nrf2 de manera alternativa a Keap1. Estos resultados demuestran que la regulación de la estabilidad de Nrf2 por GSK-3 representa un mecanismo desconocido hasta ahora que es independiente de la vía de canónica de degradación por Keap1.

Nrf2 es una proteína de carácter muy ácido con un 16% de residuos de serina, treonina y tirosina, que son posibles dianas de fosforilación por varias quinasas. Como se ha descrito en la Introducción, varios agentes quimioprotectores activan las cascadas de señalización PI3K/Akt y MAP quinasas ERK1/2, p38, y JNK. El mecanismo molecular implicado en la regulación de estas quinasas es aún desconocido pero varias evidencias sugieren que muchos de ellos alteran el balance entre fosforilación y defosforilación, inhibiendo fosfatasas sensibles al estado redox. Por ejemplo, la tBHQ inhibe a la fosfatasa PTEN conduciendo a la activación de Akt (183). En esta Tesis, hemos utilizado el ácido nordihidroguayarático (NDGA) como compuesto modelo para determinar cómo los agentes quimioprotectores pueden regular Nrf2 a través de la activación de varias vías de señalización. La Fig. 43 representa los hallazgos más relevantes de esta parte del estudio sobre la señalización del NDGA y los niveles de Nrf2. Durante las primeras horas de tratamiento con NDGA, Akt y p38 se inhibieron con cinéticas similares, mientras que apenas se apreció efecto sobre JNK y ERK1/2. Sin embargo, a tiempos más largos, el tratamiento con NDGA provocó la activación de las cuatro vías de señalización examinadas. El aumento de los niveles de Nrf2 correlacionó con las cinéticas de fosforilación de Akt, p38 y JNK. Más importante aún fue la observación de que estas cinéticas fueron similares en fibroblastos que carecen de Keap1, apoyando de nuevo la existencia de un mecanismo independiente de Keap1.

La inhibición de GSK-3 se produce predominantemente a través de la fosforilación de la Ser21 de la isoforma  $\alpha$  o Ser9 de la isoforma  $\beta$  por ejemplo por Akt o PKA. Además, la activación de p38 y ERK1/2 reduce la actividad de GSK-3 $\beta$  humana mediante la fosforilación de la Thr390 (Ser289 en ratón) y de la Thr43, respectivamente. Por tanto, analizamos la fosforilación de estos residuos como indicadores del estado de inhibición de GSK-3. El NDGA, que cooperó con los inhibidores de GSK-3 para incrementar los niveles de Nrf2, provocó un aumento en la fosforilación de la serina 9 y de la treonina 390 de GSK-3 $\beta$ . Esto significa que GSK-3 $\beta$  integra varias señales inhibitorias relacionadas con factores de crecimiento (vía de PI3K/Akt) y de estrés (vías de p38 y JNK). El aumento máximo de los niveles de Nrf2 corresponde con el momento en que la actividad de Akt, p38 y JNK es máxima, sugiriendo que, al menos en el caso del NDGA, la modulación de



**Figure 43. Dual regulation of Nrf2 protein levels by Keap1 and GSK-3/β-TrCP by NDGA.** In this graph, Nrf2 protein levels are represented as Nrf2 flux to provide positive pressure toward transcriptional expression of phase II genes. **A**, In resting cells (low-serum medium), Nrf2 flux is firmly blocked by Keap1-induced degradation (red traffic light). At the same time, signaling pathways are partially inhibited, meaning that GSK-3 is partially active, and therefore GSK-3/β-TrCP should only moderately contribute to reduce Nrf2 flux (yellow traffic light). **B**, During short-term NDGA treatment, Keap1 is inactivated and newly synthesized Nrf2 maintains a modest Keap1-independent Nrf2 flux; regarding signaling, NDGA, at least through receptor tyrosine kinase inhibition, represses Akt (Akt (S473)), resulting in GSK-3 activation. In such a scenario Nrf2 flux is mainly stopped by GSK-3/β-TrCP. **C**, In longer term NDGA treatment, Keap1 remains inhibited (green traffic light); signaling pathways restore Akt activity to basal levels but p38 and JNK exhibit a more robust activation leading to GSK-3 inhibition (phospho-Thr390). In this model, Keap1 seems to exert a broad Nrf2 flux control mainly in response to compounds able to modify the redox-sensitive Cys within Keap1, whereas GSK-3/β-TrCP performs a fine Nrf2 tuning in response to signaling events. Both mechanisms cooperate to adapt Nrf2 flux and the subsequent phase II response to specific demands aimed at maintaining redox homeostasis and protecting cells against oxidative damage.

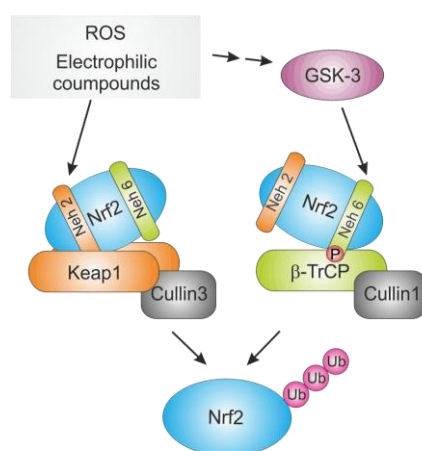
## DISCUSIÓN

estas quinasas es un factor importante en la regulación de Nrf2.

Estos resultados evidencian que la regulación de la estabilidad de Nrf2 depende, por un lado, en la vía de Keap1 y por otro, en la activación de varias vías de señalización que convergen en GSK-3 (Fig. 44). Por tanto, ambos mecanismos deben trabajar coordinadamente para adaptar la función de Nrf2 a diferentes situaciones fisiológicas. La Fig. 44 muestra un mecanismo de degradación dual que permite la integración de ambas vías en función de las condiciones fisiológicas y patológicas, como las que se exponen a continuación:

(i) En situación normal en presencia de factores de crecimiento y factores tróficos, se requiere una actividad mínima de Nrf2 para mantener la expresión basal de los genes de fase II. Bajo estas circunstancias, los grupos tiol de las cisteínas reactivas de Keap1 no se encuentran modificadas porque los agentes electrofílicos y prooxidantes están presentes en muy baja proporción. Por su parte, GSK-3  $\alpha$  y  $\beta$  deben estar inhibidas por la fosforilación de Akt u otras quinasas en las Ser21 y Ser9, respectivamente. Por consiguiente, la degradación de Nrf2 ocurre principalmente vía Keap1-Cul3/Rbx1.

(ii) Bajo condiciones de incipiente estrés oxidativo y depleción de factores de crecimiento o tróficos, los grupos tioles de Keap1 habrán sido modificados modestamente, degradando Nrf2 con poca eficacia. No obstante, como GSK-3 está activa en ausencia de factores de crecimiento, Nrf2 podría ser degradado a través del complejo SCF/ $\beta$ -TrCP. La supresión de la actividad de Nrf2 por debajo de los niveles basales conduciría a una disminución de la expresión basal de los genes antioxidantes y detoxificantes, sensibilizando a las células frente a estrés oxidativo. En consecuencia, se producirá una acumulación de especies reactivas de oxígeno que oxidarán las cisteínas críticas de Keap1,



**Figure 44. Dual regulation of Nrf2 protein levels by Keap1 and GSK-3/ $\beta$ -TrCP.** Scheme showing the main participants in the “dual degradation” model.

promoviendo la inactivación de Keap1, evitando la degradación de Nrf2 y mediando el restablecimiento de la homeostasis redox. En este escenario, Keap1 cicla entre su estado reducido y oxidado, de manera que puede compensar las fluctuaciones redox que resultan de la degradación de Nrf2 por  $\beta$ -TrCP.

(iii) Por último, en presencia de altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno, y tras la recuperación de los factores de crecimiento y factores tróficos, se produciría la inhibición de varias fosfatasa por estrés oxidativo, resultando en la activación de Akt que fosforila GSK-3, causando su inactivación (141). Al mismo tiempo, la modificación de los grupos tiol de Keap1 provoca su inactivación dando lugar a la estabilización de Nrf2, que alcanza sus niveles máximos. Entonces, Nrf2 se trasloca al núcleo donde promueve la inducción de los genes de fase II. Finalmente, cuando se recupera la homeostasis redox celular, Akt será inhibido por la acción de las fosfatasa, y GSK-3 estará activo. Tras esta activación, GSK-3 fosforilará a Nrf2 marcándolo para su degradación a través del complejo SCF/ $\beta$ -TrCP. En estas circunstancias, el eje GSK-3/ $\beta$ -TrCP debe ser el mecanismo predominante a través del cual Nrf2 es ubiquitinado y dirigido a degradación por el proteasoma 26S. Este modelo tiene un importante corolario con respecto al destino celular: si GSK-3 se activa antes de recuperar la homeostasis redox, las células morirán como consecuencia del estrés oxidativo.

Esta hipótesis explicaría el comportamiento de Nrf2 en presencia de agentes quimiopreventivos que actúan mediante un mecanismo dual, esto es, a través de la inhibición de Keap1 y la activación de vías de señalización celular. Para el caso del NDGA, la etapa (ii) se identificaría con el tratamiento a corto plazo, en el que los niveles de Nrf2 disminuyen. Por su parte, la fase (iii) correspondería a la respuesta frente al NDGA a largo plazo, en la que los niveles de Nrf2 así como de las enzimas de fase II se encuentran incrementados, generando una potente respuesta antioxidante para favorecer la supervivencia celular y la recuperación de la homeostasis redox celular.

Este modelo de degradación dual supone un nuevo abordaje en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas frente a diversas patologías relacionadas con estrés oxidativo. Por ejemplo, en varios tumores de pulmón, vejiga, mama, cerebro y cuello se ha descrito que la actividad de Keap1 se encuentra reducida (81), sugiriendo que los niveles aumentados de Nrf2 pueden, en ciertas circunstancias, contribuir al desarrollo de enfermedades neoplásicas. Por tanto, podemos especular que los fármacos que activan GSK-3, como los inhibidores de Akt, deben tener un valor terapéutico dado que disminuirían los niveles de Nrf2 a través de la estimulación de la vía de degradación

## DISCUSIÓN

mediada por  $\beta$ -TrCP. Con respecto a patologías neurodegenerativas, como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, o incluso durante el proceso normal de envejecimiento, donde se ha descrito una actividad exacerbada de GSK-3, especulamos que la degradación de Nrf2 a través del eje GSK-3/ $\beta$ -TrCP puede ser la responsable del estrés oxidativo que acompaña a estas situaciones. En estas circunstancias, los agentes quimiopreventivos que bloquean la actividad de Keap1 conduciendo a un incremento de los niveles de Nrf2, como el sulforafano, pueden favorecer la recuperación de la homeostasis redox.

## 2 Caracterización del mecanismo molecular de degradación mediada por la vía de GSK-3/ $\beta$ -TrCP.

Algunos factores de transcripción, incluyendo  $\beta$ -catenina y Snail, están sometidos a una regulación dual mediada por GSK-3 en la que la quinasa controla su localización subcelular y su degradación. GSK-3 actúa fosforilando estos factores de transcripción en un grupo de serinas, modulando así su distribución subcelular y su ubiquitinación mediada por el complejo SCF/ $\beta$ -TrCP (240). De acuerdo con los resultados presentados, GSK-3 regula la estabilidad de Nrf2 promoviendo su degradación por el complejo SCF/ $\beta$ -TrCP. El dominio Neh6 de Nrf2 presenta una región conservada que contiene una secuencia consenso de reconocimiento por  $\beta$ -TrCP. Este motivo se caracteriza por la presencia de una secuencia DSG seguido de una isoleucina y una serina fosforilable. Esta secuencia DSGIS es idéntica a la que se ha encontrado en el receptor de eritropoyetina (EpoR) (147) y la proteína YAP (*Yes-associated protein*) (237).

La mayoría de los sustratos de las CDLs (*Cullin Dependent Ligases*) han de ser modificados postraduccionalmente para ser reconocidos con alta afinidad por los complejos CDL. Ejemplos de ello son I $\kappa$ B $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ , la ciclina D1 y  $\beta$ -catenina. I $\kappa$ B $\alpha$  es fosforilado por IKK $\beta$  permitiendo su reconocimiento por el complejo SCF. Bajo condiciones de normoxia, HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado en la Pro<sup>564</sup>, marcándolo para degradación por el complejo Cul2-VHL-E3 ligasa (99). La ciclina D1 es fosforilada por ERK2 en la Thr286, promoviendo su degradación por el complejo Cul7-Fbw8-E3 ligasa (161). Por último, en ausencia de Wnt, GSK-3 $\beta$  fosforila  $\beta$ -catenina, aumentando así su afinidad por el complejo SCF, que induce su degradación (224). En este contexto, la degradación de Nrf2 mediada por el complejo Cul3/Keap1 es una excepción, puesto que Nrf2 se une a Keap1 sin necesidad de ser modificado previamente. En este caso, las modificaciones postraduccionales tanto de Keap1 en varias Cys, como de Nrf2 en la Ser<sup>40</sup> promueven el efecto contrario, es decir, la disociación del complejo.

Como se ha mostrado en la sección de Resultados, en el grupo de seis serinas del dominio Neh6 existe un dominio de fosforilación por GSK-3 que confiere inestabilidad a Nrf2, ya que las seis sustituciones de estas Ser por Ala suponen una pérdida de fosforilación por esta quinasa y un incremento de su vida media. La fosforilación de este dominio por GSK-3 provoca además un incremento de la asociación entre Nrf2 y  $\beta$ -TrCP, promoviendo una mayor ubiquitinación de Nrf2. Además, la versión Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A</sup>-V5 no se asocia con  $\beta$ -TrCP ni su patrón de ubiquitinación se modifica por GSK-3. Estos resultados indican que Nrf2 presenta en el dominio Neh6 un motivo de degradación mediada por GSK-3 y  $\beta$ -TrCP y que es independiente de Keap1. Utilizando un abordaje completamente diferente, el grupo del Dr Hayes (145) describió un dominio de degradación independiente de Keap1 entre los aminoácidos 329-339 del dominio Neh6 de Nrf2 que regula su estabilidad durante condiciones de estrés oxidativo, es decir, cuando la E3 ligasa Keap1 está inhibida. Sin embargo, esta región no fue señalada entonces como un dominio de reconocimiento por  $\beta$ -TrCP ni como una posible secuencia de fosforilación por GSK-3.

La generación de proteínas de fusión de CFP-Neh2 o EGFP-Neh6 de Nrf2 nos permitió determinar que ambos dominios confieren inestabilidad a las proteínas fluorescentes y que actúan de manera independiente uno del otro. Estas quimeras podrían ser una herramienta importante para el desarrollo de fármacos selectivos para cada una de las vías de degradación de Nrf2, puesto que con estas proteínas podemos monitorizar cada vía por separado. Un abordaje similar fue realizado por Smirnova utilizando una quimera Neh2-luciferasa para analizar a tiempo real diferentes inhibidores de Keap1 (196). Por otro lado, experimentos preliminares con estas proteínas de fusión indican su utilidad como inhibidores de Keap1 o de GSK-3/ $\beta$ -TrCP, puesto que desplazan Nrf2 endógeno de las E3 ligasas respectivas, promoviendo su estabilización.

Nrf2 contiene alrededor de 600 aminoácidos, según la especie, de los cuales 98 son residuos de serina, treonina y tirosina. El hecho de que Nrf2 sea una proteína altamente inestable cuya vida media es muy corta y que además contenga varias secuencias fosforilables por GSK-3, complica la identificación de los residuos fosforilados. Hasta la fecha, los estudios por espectrometría de masas MALDI-TOF sólo han identificado varios sitios de fosforilación que parecen tener una implicación minoritaria en la regulación de Nrf2. En esta Tesis, para analizar la fosforilación por GSK-3 de la secuencia de seis serinas del dominio Neh6, empleamos un abordaje reduccionista que incorpora las siguientes estrategias: (i) la generación de una proteína de fusión denominada EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>, que contiene solamente los 56 aminoácidos de Nrf2 del dominio Neh6; (ii) la



## DISCUSIÓN

mutagénesis dirigida sobre los residuos críticos del dominio Neh6; y (iii) el uso de geles de electroforesis bidimensional para incrementar la resolución entre la proteína fosforilada y no fosforilada. Esta aproximación nos permitió detectar dos filas de puntos diferentes electroforéticamente. La fila de puntos más baja, que corresponde a la de mayor movilidad electroforética, representa las modificaciones postraduccionales que son debidas a la proteína amarilla fluorescente y no a Nrf2, ya que se observó un patrón similar cuando se examinó la proteína EYFP. La línea de puntos con mayor masa molecular correlaciona con las fosforilaciones que ocurren dentro del dominio Neh6, ya que desaparecen cuando los lisados celulares son tratados con la fosfatasa  $\lambda$ . Verificamos además que estos puntos corresponden a la proteína fosforilada porque al añadir la quinasa activa GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$ , al menos aparecen dos puntos nuevos más ácidos en la misma fila que los puntos correspondientes a formas fosforiladas de EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5. Por otro lado, la aparición de estos puntos de carácter más ácido coincide con la disminución de la intensidad de las formas fosforiladas de rangos más básicos indicando que GSK-3 aumenta el grado de fosforilación de EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5.

El análisis de las versiones mutadas de EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 por electroforesis bidimensional indica que las Ser<sup>342</sup> y Ser<sup>347</sup> que están situadas precediendo a residuos de Pro, están fosforiladas en ausencia de GSK-3, sugiriendo que Ser/Thr quinasas dirigidas a Pro podrían ser las encargadas de estas modificaciones. Estas serinas también se fosforilaron en presencia de GSK-3, sugiriendo que GSK-3 podría fosforilarlas sin necesidad de primado. Es interesante además que el mutante que carece de las Ser<sup>342</sup> y Ser<sup>347</sup> se fosforila aún por GSK-3, pero con un rendimiento mucho menor y generando un patrón de puntos distorsionado. Este resultado es consistente con el papel de GSK-3 en la fosforilación de las Ser<sup>335</sup> y Ser<sup>338</sup> dentro del dominio de degradación DpSGIpS. Asimismo, el hecho de que los puntos más abundantes en este mutante correspondan con los de la proteína no fosforilada sugieren que GSK-3 es más efectiva en la fosforilación de este dominio cuando las Ser<sup>342</sup> y Ser<sup>347</sup> han sido previamente fosforiladas. De hecho, GSK-3 exhibe preferencia por los sustratos que han sido previamente fosforilados en la secuencia consenso (S/T)X<sub>(1-4)</sub>p(S/T), donde X es cualquier aminoácido y p(S/T) en un residuo de Ser o Thr que ha sido primeramente fosforilado por otras quinasas, llamadas primadoras (123).

Los resultados presentados avalan que este dominio insensible al estado redox contiene un grupo de cuatro serinas (en ratón son las Ser<sup>335</sup>, Ser<sup>338</sup>, Ser<sup>342</sup> y Ser<sup>347</sup>) que son fosforiladas por GSK-3 y que constituyen un fosfodominio de degradación por  $\beta$ -TrCP.



### 3 Análisis estructural del complejo Nrf2/ $\beta$ -TrCP.

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear se ha convertido en los últimos años en una poderosa herramienta para la identificación de las interacciones proteína-proteína. Esta técnica se utiliza para comprender el modo de unión entre una molécula y su ligando, pero también para analizar posibles fármacos que pueden perturbar estas interacciones. Mediante la espectroscopía RMN se pueden detectar interacciones débiles y transitorias y posibles contactos atómicos entre las moléculas que forman las interacciones proteína-ligando.

La estructura tridimensional del complejo  $\beta$ -TrCP/Skp1 unido a un péptido de  $\beta$ -catenina fue determinada en primer lugar mediante estudios de cristalografía de rayos X (222). Posteriormente, el grupo del Dr. Bertho, mediante estudios de RMN, caracterizó la interacción entre el dominio WD40 de  $\beta$ -TrCP humano y un péptido de  $\beta$ -catenina que comprende el dominio de degradación por esta E3 ligasa (146). Este mismo grupo ha mapeado los sitios de unión a  $\beta$ -TrCP de otros ligandos suyos como Vpu, I $\kappa$ B $\alpha$  o ATF-4 (30, 172-173). Estos ligandos comparten un motivo común DpSGX<sub>(1-4)</sub>pS, en el cual se requiere la fosforilación de estas serinas para la interacción con  $\beta$ -TrCP.

Los estudios de espectroscopía de RMN indican que el dominio de degradación de Nrf2 posee un alto grado de estructuración con una conformación en giro que se encuentra también en otros sustratos de  $\beta$ -TrCP, como  $\beta$ -catenina o ATF4 (174). Nuestros datos sugieren que el motivo DpSGIpSLN adopta una estructura en giro en el que las serinas fosforiladas pSer<sup>344</sup> y pSer<sup>347</sup> (pSer<sup>335</sup> y pSer<sup>338</sup> en Nrf2 murino) tienen un papel fundamental en la interacción con el dominio WD40 de  $\beta$ -TrCP. Sin embargo, las fosfoserinas adyacentes pSer<sup>351</sup> y pSer<sup>356</sup> parecen no ser relevantes en la interacción. Esta interpretación es consistente con el hecho de que en otros sustratos de  $\beta$ -TrCP, GSK-3 fosforila un grupo de serinas o treoninas sólo en la secuencia consenso DpSGX<sub>(1-4)</sub>pS, siendo entonces reconocida por  $\beta$ -TrCP a través del dominio WD40 (60, 195).

Hemos comparado la interacción entre Nrf2/ $\beta$ -TrCP con la descrita para  $\beta$ -catenina/ $\beta$ -TrCP. El dominio de degradación en Nrf2 humano (<sup>343</sup>DpSGIpS<sup>347</sup>) es un residuo más corto que el de  $\beta$ -catenina (<sup>32</sup>DpSGIHpS<sup>37</sup>). A pesar de la similitud de la secuencia, este hecho cambia el patrón de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y los residuos implicados. Como se muestra en la superimposición de estructuras presentada en la Fig. 45A, la pSer<sup>344</sup> del dominio de Nrf2 humano interacciona con  $\beta$ -TrCP en una posición idéntica a la que se ha descrito para la pSer<sup>33</sup> de  $\beta$ -catenina humana. Sin embargo, las posiciones de los otros residuos incluyendo la pSer<sup>347</sup> difieren. Así, la Ile<sup>35</sup> de

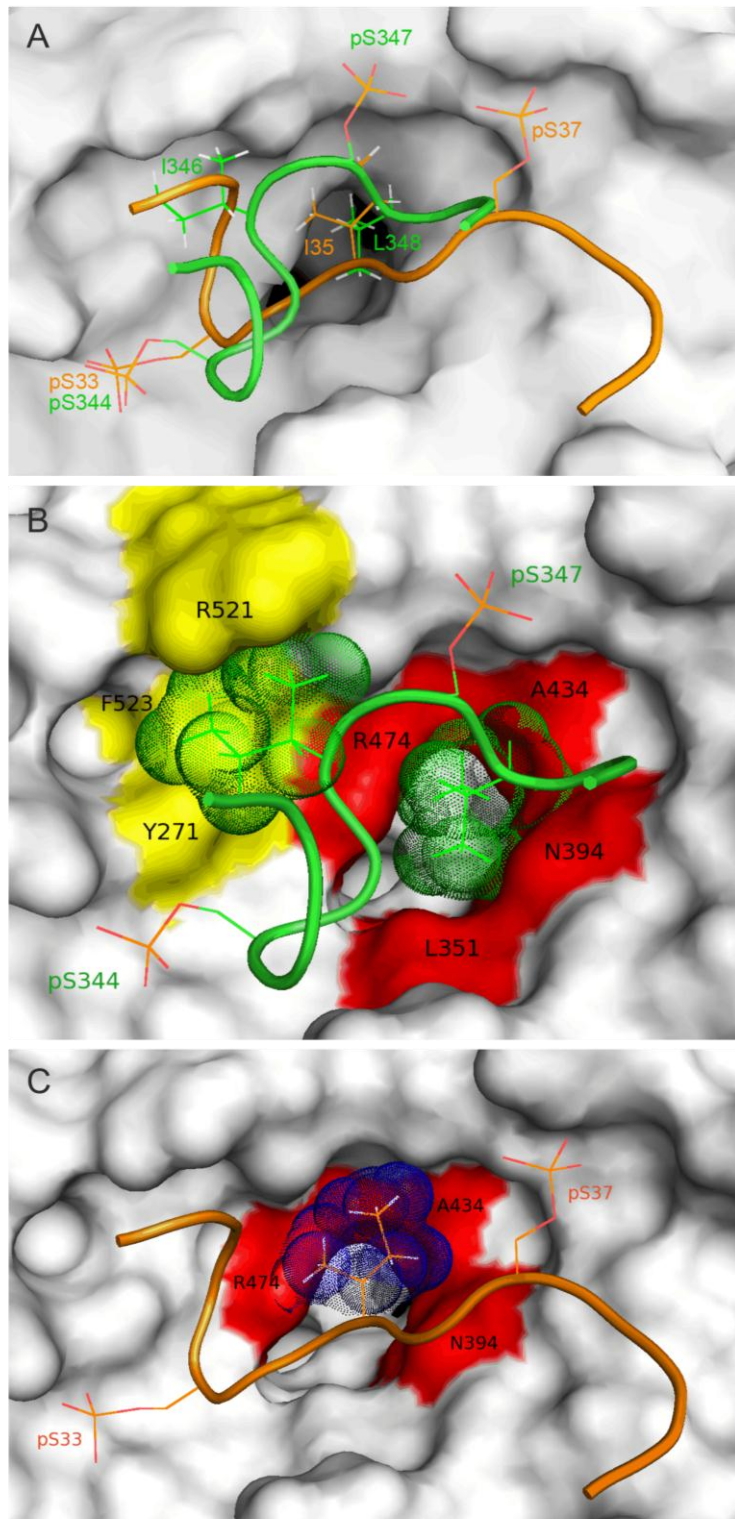
## DISCUSIÓN

$\beta$ -catenina humana interacciona con el canal central hidrofóbico del dominio WD40 de  $\beta$ -TrCP mientras que la Ile<sup>346</sup> de Nrf2 humano interacciona con otro bolsillo hidrofóbico formado por la Phe<sup>523</sup>, la Tyr<sup>271</sup> y la Arg<sup>521</sup> de  $\beta$ -TrCP (Fig. 45B y C). La función de la Ile<sup>35</sup> de  $\beta$ -catenina es asumida en Nrf2 humano por la Leu<sup>348</sup> (Fig. 45B). Este residuo es esencial en la estabilización de la interacción entre la fosfoserina C-terminal pSer<sup>347</sup> dentro del motivo WD40.

Estas diferencias entre Nrf2 y  $\beta$ -catenina en la orientación y conformación de los residuos DpSGX<sub>(1-4)</sub>pS también se presentan en otros sustratos de  $\beta$ -TrCP caracterizados por RMN como son Vpu, I $\kappa$ B $\alpha$  o ATF-4. Dependiendo del número y de la naturaleza de los residuos X<sub>(1-4)</sub> estos péptidos presentan una disposición espacial diferente a la de  $\beta$ -catenina, siendo el caso más extremo el de Vpu, donde debido a la carga negativa de la secuencia AEDpSGNEpSEGE, ninguno de estos residuos interacciona con el canal hidrofóbico de  $\beta$ -TrCP, sino que lo hace una Leu posicionada en el extremo N terminal del péptido.

En nuestro modelo, tres son los determinantes estructurales fundamentales en la estabilización de la interacción entre Nrf2 con  $\beta$ -TrCP. En primer lugar, el grupo fosfato de la serina pSer<sup>344</sup> de Nrf2, así como el de la pSer<sup>33</sup> en el caso de  $\beta$ -catenina, forma enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas con las Arg<sup>285</sup> y Ser<sup>325</sup> de  $\beta$ -TrCP. En segundo lugar, el residuo hidrofóbico cercano a la fosfoserina N-terminal, la Ile<sup>346</sup>, interacciona con el canal hidrofóbico formado por la Phe<sup>523</sup>, la Tyr<sup>271</sup> y la Arg<sup>521</sup> de  $\beta$ -TrCP. En tercer lugar, la interacción entre un residuo hidrofóbico con el canal central de  $\beta$ -TrCP (Leu<sup>348</sup> en Nrf2 o Ile<sup>35</sup> en  $\beta$ -catenina) debe ser preservada para permitir la estabilización de la fosfoserina C-terminal pSer<sup>347</sup> con la Arg<sup>431</sup> o la Arg<sup>521</sup> de  $\beta$ -TrCP.

Como confirmación adicional a los datos de RMN, analizamos la asociación entre los mutantes de Nrf2 murino y de  $\beta$ -TrCP. Las mutaciones de las Ser<sup>335</sup> y Ser<sup>338</sup> de mNrf2 (equivalentes a las Ser<sup>344</sup> y Ser<sup>347</sup> de hNrf2) fueron suficientes para perder la asociación con  $\beta$ -TrCP. Por su parte, la presencia de las Arg<sup>285</sup>, Arg<sup>474</sup> y Arg<sup>521</sup> del dominio WD40 de  $\beta$ -TrCP es necesaria para la unión con  $\beta$ -TrCP ya que cuando fueron cambiadas a Glu, la asociación entre Nrf2 y  $\beta$ -TrCP disminuyó sustancialmente. Estas observaciones refuerzan nuestra interpretación de los datos de RMN que indicaban un papel relevante de estos tres residuos en la estabilización de la estructura: la Arg<sup>285</sup> con la pSer<sup>344</sup>; la Arg<sup>474</sup> con la Gly<sup>345</sup> y con la Ile<sup>346</sup>; la Arg<sup>521</sup> con la Ile<sup>346</sup> y posiblemente con la pSer<sup>347</sup>.



**Figure 45. Comparison of the docked structure of Nrf2 with the crystal structure of the complex  $\beta$ -TrCP/ $\beta$ -catenin peptide.** **A**, Superimposition of human Nrf2 (green) and human  $\beta$ -catenin (orange) in the best docking structures of the complexes with  $\beta$ -TrCP (PDB ID code 1P22). **B**, Amino acids of  $\beta$ -TrCP that participate in hydrophobic interactions with Nrf2 are shown in black letters. The hydrophobic cluster in red surface, located at the entrance of the central channel of  $\beta$ -TrCP, interacts with the side chain of Leu<sup>348</sup> shown in green dots surface. The hydrophobic cluster in yellow surface interacts with the side chain of Ile<sup>346</sup> shown in green dots surface. **C**, Amino acids of  $\beta$ -TrCP that participate in hydrophobic interactions with  $\beta$ -catenin are shown in black letters. The hydrophobic cluster in red surface, located at the entrance of the central channel of  $\beta$ -TrCP, interacts with the side chain of Ile<sup>35</sup> of  $\beta$ -catenin shown in blue dots surface.

## DISCUSIÓN

Diversos estudios demuestran que  $\beta$ -TrCP regula negativamente el crecimiento celular y la movilidad de células tumorales en cáncer de pulmón, de mama o gástrico (82, 117, 206) ya que su inactivación provoca un incremento de los niveles de sustratos como Cdc25A o  $\beta$ -catenina. El grupo del Dr. Park ha analizado 95 muestras de pacientes con cánceres gástricos y ha encontrado 5 mutaciones (5.3 %) en  $\beta$ -TrCP: A99V, C206Y, G260E, H342Y y H425Y. Las tres últimas se encuentran en torno o sobre el dominio WD40 (G260E, a 5 aminoácidos del WD1, H342Y en WD2 y H425Y en WD4), responsable de la unión de los sustratos (117). Considerando que estas mutaciones imposibilitan la degradación de sus sustratos promoviendo el desarrollo tumoral, planteamos la posibilidad de que el incremento de los niveles de Nrf2 en estos tipos de cáncer pueda estar relacionado con la presencia de mutaciones en  $\beta$ -TrCP en los residuos que participan en la interacción con Nrf2, que hemos descrito con detalle en esta Tesis.

### 4 Relevancia funcional de la regulación de Nrf2 por el eje GSK-3/ $\beta$ -TrCP.

La relevancia funcional del control de Nrf2 por GSK-3/ $\beta$ -TrCP fue analizada *in vivo* utilizando ratones que presentan una delección condicional de GSK-3 $\beta$  en neuronas. Observamos que la vía de degradación mediada por GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -TrCP es necesaria para mantener niveles bajos de Nrf2 y de los genes de fase II. Los ratones con depleción condicional de GSK-3 $\beta$  mostraron niveles aumentados de GSH y disminuidos de GSSG en sus hipocampos, indicando que estos ratones presentan niveles basales menores de estrés oxidativo en comparación con los ratones control. Por otra parte, los animales deficientes en GSK-3 $\beta$  en neuronas de hipocampo tienen niveles más bajos de proteínas carboniladas y de lípidos peroxidados. Estos resultados demuestran la importancia de la regulación de Nrf2 por GSK-3 $\beta$ , ya que en su ausencia estos ratones presentan una respuesta antioxidante aumentada.

Además hemos analizado la relevancia de la regulación de Nrf2 en el contexto de estrés oxidativo inducido por kainato. Utilizando ratones deficientes en Nrf2, observamos que Nrf2 promueve una respuesta antioxidante frente a la excitotoxicidad provocada por kainato, ya que estos ratones mostraron niveles superiores de producción de ROS y muerte celular en comparación con los ratones silvestres. En concordancia con estos resultados, el grupo del Dr. Johnson ha descrito que el tratamiento con kainato provoca ataques epilépticos más prolongados en los ratones Nrf2<sup>-/-</sup> que en los controles y mayor astrogliosis y microgliosis en los hipocampos de estos animales (125). Sin embargo, a pesar de que Nrf2 promueve una respuesta funcional frente a kainato, numerosas neuronas aún sucumben a este insulto excitotóxico. Este hecho indica que la activación

del eje Nrf2/HO-1 es fundamental para aumentar la respuesta antioxidante y mitigar el efecto del estrés oxidativo. Las protoporfirinas de cobalto y estaño han sido utilizadas para modular los niveles de HO-1 directamente en tejido periférico. Sin embargo, estos compuestos no atraviesan la barrera hematoencefálica eficientemente (139). Es por ello que en esta Tesis nos hemos centrado en activar farmacológicamente Nrf2 inhibiendo las dos vías de degradación de Nrf2, Keap1 y GSK-3/ $\beta$ -TrCP, con SFN y litio, en un modelo de estrés oxidativo inducido por kainato. El SFN, que atraviesa la barrera hematoencefálica, ha sido utilizado en varios modelos *in vivo* de inflamación y enfermedad de Parkinson, demostrando que es capaz de activar la respuesta antioxidante a través de Nrf2 (92-93, 104). Con respecto a GSK-3, el grupo del Dr. Cuadrado demostró que la sobreexpresión de GSK-3 sensibilizaba a células de neuroblastoma N2A frente a daño oxidativo generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (180) y el grupo del Dr. Pallas describió que una exposición prolongada a kainato conduce a la desregulación de ERK y Akt, a la activación de GSK-3 y al incremento de los niveles de caspasa-3 (33). Además, varios estudios han mostrado que GSK-3 es un componente molecular importante en el destino de las neuronas de hipocampo y que su inhibición con litio tiene un efecto neuroprotector (69, 151, 159, 166, 199, 230). Finalmente, evidencias indirectas indicando que GSK-3 está hiperactivada en condiciones excitotóxicas han sido obtenidas de biopsias de pacientes con epilepsia refractaria donde las neuronas displásicas exhibieron alta expresión de GSK-3 $\beta$  (32) y niveles aumentados de tau fosforilado por GSK-3 (191).

La combinación de ambos tratamientos, SFN y litio, en cultivos celulares de N2A, supuso una mayor inducción de Nrf2 y HO-1 en comparación con cada tratamiento por separado. En el modelo de excitotoxicidad mediada por kainato, las secciones de hipocampo pre-tratadas con litio o SFN exhibieron niveles más bajos de ROS y muerte celular que los hipocampos tratados únicamente con kainato. Como se puede observar en la Fig. 41, la contribución del litio parece ser más significativa en esta cooperación, ya que por sí sólo produjo una reducción más drástica de estos parámetros en comparación con la inducida por el SFN. Este hecho puede deberse a las condiciones experimentales utilizadas en estos ensayos. En este contexto, el litio se añadió sobre las secciones de hipocampo resultando en una inhibición directa de GSK-3, cuyo efecto se pudo detectar tras sólo 2 h de incubación con kainato. Sin embargo, es muy posible que este tiempo sea muy corto para que el SFN promueva una fuerte respuesta antioxidante comparable a la del litio tras la exposición a kainato. Por último, cuando se combinaron ambos tratamientos, las secciones de hipocampo mostraron niveles menores de ROS y de muerte celular que los hipocampos controles, demostrando nuevamente la importancia de ambos mecanismos de

## DISCUSIÓN

degradación de Nrf2 dependientes de Keap1 y GSK-3 en la modulación de la respuesta antioxidante frente a excitotoxicidad mediada por kainato.

### 5 Observaciones finales y perspectivas futuras.

Hasta la fecha, la principal estrategia farmacológica para activar la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 estaba basada en la modificación de las cisteínas reactivas de la E3 ligasa Keap1 para impedir la degradación de Nrf2. Sin embargo, en esta Tesis hemos demostrado que existe un mecanismo de degradación alternativo de Nrf2 que es dependiente de la quinasa GSK-3 y de la E3 ligasa  $\beta$ -TrCP. Esta E3 ligasa también regula otros sustratos como Snail, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ K $\epsilon$ , WEE1, CDC25A, CDC25B,  $\beta$ -catenina, PDC4, REST, ATF4, PRL-R, IFNR, p63, GHR, Bora, STAT1, Gli2, Gli3 y Xom (1, 63, 108, 127, 163-164, 214-215, 240-241). Teniendo en cuenta que la mayoría de estas proteínas están implicadas en proliferación celular, la siguiente cuestión será analizar si la actividad de Nrf2 está regulada por señales proliferativas a través del eje GSK-3/ $\beta$ -TrCP. En este contexto, GSK-3 estaría inhibida por varias quinasas durante la proliferación celular, provocando una regulación positiva de Nrf2, que supondría un mecanismo de protección frente a las especies reactivas de oxígeno que se generan durante la progresión del ciclo celular.

Asimismo, hemos demostrado en un modelo de excitotoxicidad neuronal inducida por kainato que para alcanzar una mayor respuesta antioxidante es necesaria la inhibición coordinada de las dos vías de degradación de Nrf2 mediadas por Keap1 y GSK-3/ $\beta$ -TrCP. Paralelamente a nuestro estudio, el grupo de la Dra. Bruno analizó el papel de GSK-3 en un modelo de excitotoxicidad mediada por kainato a través de la inhibición de la vía canónica de Wnt (25, 27). Cuando esta vía está inhibida,  $\beta$ -catenina es fosforilada primero por CKI, y, a continuación, por GSK-3, en un complejo formado por APC, axina,  $\beta$ -catenina y GSK-3. Esta fosforilación es reconocida por el complejo SCF/ $\beta$ -TrCP, provocando su degradación. En presencia de Wnt, se inhibe la actividad de GSK-3 y  $\beta$ -catenina no puede ser fosforilada, resultando en su estabilización y su translocación al núcleo, donde el complejo  $\beta$ -catenina/TCF/LEF promueve la transcripción de los genes Wnt: c-myc, ciclina D1, DKK1, axina 2, LEF, entre otros. En estos trabajos de la Dra. Bruno se muestra que la inhibición de la vía canónica con un antagonista de Wnt, es decir la activación de GSK-3, está asociada con un incremento de la muerte neuronal y del número de ataques epilépticos causados por el tratamiento con kainato. Estos efectos fueron suprimidos cuando los animales se trataron con litio. Considerando que la vía canónica de Wnt puede modular la actividad de GSK-3 para sensibilizar a las neuronas frente a daño



oxidativo y teniendo en cuenta los resultados mostrados en esta Tesis, proponemos la posibilidad de que la activación de la vía canónica de Wnt promueva un efecto protector frente a estrés oxidativo mediado por Nrf2.

En conjunto, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral describen un nuevo mecanismo de regulación de Nrf2 mediado por GSK-3/ $\beta$ -TrCP que actúa coordinado con la vía clásica de Keap1. Esta nueva vía sitúa a GSK-3 como un interruptor molecular de apagado de la defensa antioxidante y aporta una nueva diana farmacológica para potenciar la respuesta antioxidante en diferentes escenarios fisiológicos y patológicos.





## ***CONCLUSIONS/CONCLUSIONES***



## Conclusions

---

1. Nrf2 is regulated through two independent degradation pathways mediated by Keap1 and by the GSK-3/ $\beta$ -TrCP axis.
2. GSK-3 functions as an integrator of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways controlling the levels of Nrf2 in response to bifunctional inducers such as NDGA.
3. Pharmacological regulation of Nrf2 through both Keap1 and GSK-3 inhibition promotes a higher increase of the antioxidant response than those compounds that target either one of those mechanisms.
4. Nrf2 is phosphorylated by GSK-3 within the Neh6 domain, promoting its degradation via the SCF/ $\beta$ -TrCP complex.
5. The DSGIS motif of Nrf2 is essential for the interaction with the WD40 domain of  $\beta$ -TrCP.
6. Mice with hippocampal absence of GSK-3 $\beta$  in neurons exhibit increased levels of Nrf2 and phase II gene products as well as increased levels of reduced glutathione and lower levels of malondialdehyde and carbonylated proteins.
7. Combination of lithium and SFN induced an increase of Nrf2 and its target genes and prevented excitotoxic neuronal death mediated by kainate in hippocampal slices.
8. This Thesis demonstrates the therapeutic value of GSK-3 as new pharmacological targets to potentiate the Nrf2 antioxidant response in different physiological and pathological scenarios.

### Conclusiones

---

1. Nrf2 se regula a través de dos vías de degradación independientes mediadas por Keap1 y por el eje GSK-3/ $\beta$ -TrCP.
2. GSK-3 actúa como un integrador de las vías de señalización de PI3K/Akt y de MAP quinasas controlando los niveles de Nrf2 en respuesta a inductores bifuncionales como el NDGA.
3. La regulación farmacológica de Nrf2 a través de la inhibición combinada de Keap1 y GSK-3 promueve un incremento mayor de la actividad antioxidante.
4. GSK-3 fosforila a Nrf2 en su dominio Neh6, provocando su degradación a través del complejo SCF/ $\beta$ -TrCP.
5. El motivo DSGIS de Nrf2 es esencial para su interacción con el dominio WD40 de  $\beta$ -TrCP.
6. Los hipocampos de ratones deficientes en GSK-3 $\beta$  en neuronas exhiben niveles aumentados de Nrf2 y de enzimas de fase II así como niveles incrementados de glutatión reducido y niveles disminuidos de malondialdehído y proteínas carboniladas.
7. La combinación del litio y sulforafano (SFN) induce un incremento de Nrf2 y de sus genes diana protegiendo frente a muerte neuronal excitotóxica inducida por kainato en secciones de hipocampo.
8. Esta Tesis Doctoral demuestra el valor terapéutico de GSK-3 como una nueva diana farmacológica para potenciar la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 en diferentes contextos fisiológicos y patológicos.

## ***BIBLIOGRAFÍA***



## Bibliografía

1. **Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler.** 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* **16**:3797-3804.
2. **Ainbinder, E., S. Bergelson, R. Pinkus, and V. Daniel.** 1997. Regulatory mechanisms involved in activator-protein-1 (AP-1)-mediated activation of glutathione-S-transferase gene expression by chemical agents. *Eur J Biochem* **243**:49-57.
3. **Alkalay, I., A. Yaron, A. Hatzubai, A. Orian, A. Ciechanover, and Y. Ben-Neriah.** 1995. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:10599-10603.
4. **An, J. H., K. Vranas, M. Lucke, H. Inoue, N. Hisamoto, K. Matsumoto, and T. K. Blackwell.** 2005. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:16275-16280.
5. **Andrews, N. C., H. Erdjument-Bromage, M. B. Davidson, P. Tempst, and S. H. Orkin.** 1993. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* **362**:722-728.
6. **Ansar, S., M. Iqbal, and M. Athar.** 1999. Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrilotriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis* **20**:599-606.
7. **Apopa, P. L., X. He, and Q. Ma.** 2008. Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J Biochem Mol Toxicol* **22**:63-76.
8. **Baird, L., and A. T. Dinkova-Kostova.** 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* **85**:241-272.
9. **Balogun, E., M. Hoque, P. Gong, E. Killeen, C. J. Green, R. Foresti, J. Alam, and R. Motterlini.** 2003. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* **371**:887-895.
10. **Ballarino, M., M. Marchioni, and F. Carnevali.** 2002. The *Xenopus laevis* beta TrCP gene: genomic organization, alternative splicing, 5' and 3' region characterization and comparison of its structure with that of human beta TrCP genes. *Biochim Biophys Acta* **1577**:81-92.
11. **Bax, A., and D. G. Davis.** 1985. MLEV-17-based twodimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **65**:355-360.
12. **Ben-Ari, Y.** 1981. Epilepsy: changes in local glucose consumption and brain pathology produced by kainic acid. *Adv Biochem Psychopharmacol* **27**:385-394.
13. **Bensasson, R. V., V. Zoete, A. T. Dinkova-Kostova, and P. Talalay.** 2008. Two-step mechanism of induction of the gene expression of a prototypic cancer-protective enzyme by diphenols. *Chem Res Toxicol* **21**:805-812.
14. **Benson, A. M., R. P. Batzinger, S. Y. Ou, E. Bueding, Y. N. Cha, and P. Talalay.** 1978. Elevation of hepatic glutathione S-transferase activities and protection against mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene by dietary antioxidants. *Cancer Res* **38**:4486-4495.
15. **Benson, A. M., Y. N. Cha, E. Bueding, H. S. Heine, and P. Talalay.** 1979. Elevation of extrahepatic glutathione S-transferase and epoxide hydratase activities by 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole. *Cancer Res* **39**:2971-2977.
16. **Benson, A. M., M. J. Hunkeler, and P. Talalay.** 1980. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:5216-5220.

17. **Bhatia, N., J. R. Herter, T. J. Slaga, S. Y. Fuchs, and V. S. Spiegelman.** 2002. Mouse homologue of HOS (mHOS) is overexpressed in skin tumors and implicated in constitutive activation of NF-kappaB. *Oncogene* **21**:1501-1509.
18. **Bienkiewicz, E. A., and K. J. Lumb.** 1999. Random-coil chemical shifts of phosphorylated amino acids. *J Biomol NMR* **15**:203-206.
19. **Bijur, G. N., and R. S. Jope.** 2003. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* **14**:2415-2419.
20. **Bijur, G. N., and R. S. Jope.** 2001. Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* **276**:37436-37442.
21. **Blair, A. S., E. Hajdуч, G. J. Litherland, and H. S. Hundal.** 1999. Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem* **274**:36293-36299.
22. **Blanco, F. J., G. Rivas, and L. Serrano.** 1994. A short linear peptide that folds into a native stable beta-hairpin in aqueous solution. *Nat Struct Biol* **1**:584-590.
23. **Bloom, D. A., and A. K. Jaiswal.** 2003. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem* **278**:44675-44682.
24. **Brigelius-Flohe, R., and L. Flohe.** 2011. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal* **15**:2335-2381.
25. **Busceti, C. L., F. Biagioni, E. Aronica, B. Rizzo, M. Storto, G. Battaglia, F. S. Giorgi, R. Gradini, F. Fornai, A. Caricasole, F. Nicoletti, and V. Bruno.** 2007. Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **48**:694-705.
26. **Calkins, M. J., R. J. Jakel, D. A. Johnson, K. Chan, Y. W. Kan, and J. A. Johnson.** 2005. Protection from mitochondrial complex II inhibition in vitro and in vivo by Nrf2-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:244-249.
27. **Caraci, F., C. Busceti, F. Biagioni, E. Aronica, F. Mastroiacovo, I. Cappuccio, G. Battaglia, V. Bruno, A. Caricasole, A. Copani, and F. Nicoletti.** 2008. The Wnt antagonist, Dickkopf-1, as a target for the treatment of neurodegenerative disorders. *Neurochem Res* **33**:2401-2406.
28. **Cenciarelli, C., D. S. Chiaur, D. Guardavaccaro, W. Parks, M. Vidal, and M. Pagano.** 1999. Identification of a family of human F-box proteins. *Curr Biol* **9**:1177-1179.
29. **Circu, M. L., and T. Y. Aw.** 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* **48**:749-762.
30. **Coadou, G., J. Gharbi-Benarous, S. Megy, G. Bertho, N. Evrard-Todeschi, E. Segeral, R. Benarous, and J. P. Girault.** 2003. NMR studies of the phosphorylation motif of the HIV-1 protein Vpu bound to the F-box protein beta-TrCP. *Biochemistry* **42**:14741-14751.
31. **Cole, A., S. Frame, and P. Cohen.** 2004. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J* **377**:249-255.
32. **Cotter, D., M. Honavar, S. Lovestone, L. Raymond, R. Kerwin, B. Anderton, and I. Everall.** 1999. Disturbance of Notch-1 and Wnt signalling proteins in neuroglial balloon cells and abnormal large neurons in focal cortical dysplasia in human cortex. *Acta Neuropathol* **98**:465-472.
33. **Crespo-Biel, N., A. M. Canudas, A. Camins, and M. Pallas.** 2007. Kainate induces AKT, ERK and cdk5/GSK3beta pathway deregulation, phosphorylates tau protein in mouse hippocampus. *Neurochem Int* **50**:435-442.



34. **Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B. A. Hemmings.** 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**:785-789.
35. **Cullinan, S. B., J. D. Gordan, J. Jin, J. W. Harper, and J. A. Diehl.** 2004. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* **24**:8477-8486.
36. **Cullinan, S. B., D. Zhang, M. Hannink, E. Arvisais, R. J. Kaufman, and J. A. Diehl.** 2003. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* **23**:7198-7209.
37. **Chan, J. Y., X. L. Han, and Y. W. Kan.** 1993. Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:11371-11375.
38. **Chan, K., and Y. W. Kan.** 1999. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12731-12736.
39. **Chanas, S. A., Q. Jiang, M. McMahon, G. K. McWalter, L. I. McLellan, C. R. Elcombe, C. J. Henderson, C. R. Wolf, G. J. Moffat, K. Itoh, M. Yamamoto, and J. D. Hayes.** 2002. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J* **365**:405-416.
40. **Chartoumpekis, D., P. G. Ziros, A. Psyrogiannis, V. Kyriazopoulou, A. G. Papavassiliou, and I. G. Habeos.** 2010. Simvastatin lowers reactive oxygen species level by Nrf2 activation via PI3K/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **396**:463-466.
41. **Chen, P. C., M. R. Vargas, A. K. Pani, R. J. Smeyne, D. A. Johnson, Y. W. Kan, and J. A. Johnson.** 2009. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:2933-2938.
42. **Chiaur, D. S., S. Murthy, C. Cenciarelli, W. Parks, M. Loda, G. Inghirami, D. Demetrick, and M. Pagano.** 2000. Five human genes encoding F-box proteins: chromosome mapping and analysis in human tumors. *Cytogenet Cell Genet* **88**:255-258.
43. **De Long, M. J., H. J. Prochaska, and P. Talalay.** 1985. Tissue-specific induction patterns of cancer-protective enzymes in mice by tert-butyl-4-hydroxyanisole and related substituted phenols. *Cancer Res* **45**:546-551.
44. **DeLano, W. L.** 2002. The PyMOL Molecular Graphics System, on World Wide Web. <http://www.pymol.org>.
45. **Deshais, R. J.** 1999. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:435-467.
46. **Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel, and C. J. Sherr.** 1998. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**:3499-3511.
47. **Ding, Q., X. He, J. M. Hsu, W. Xia, C. T. Chen, L. Y. Li, D. F. Lee, J. C. Liu, Q. Zhong, X. Wang, and M. C. Hung.** 2007. Degradation of Mcl-1 by  $\beta$ -TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol* **27**:4006-4017.
48. **Ding, Q., W. Xia, J. C. Liu, J. Y. Yang, D. F. Lee, J. Xia, G. Bartholomeusz, Y. Li, Y. Pan, Z. Li, R. C. Bargou, J. Qin, C. C. Lai, F. J. Tsai, C. H. Tsai, and M. C. Hung.** 2005. Erk associates with and primes GSK-3 $\beta$  for its inactivation resulting in upregulation of  $\beta$ -catenin. *Mol Cell* **19**:159-170.
49. **Dinkova-Kostova, A. T., J. W. Fahey, and P. Talalay.** 2004. Chemical structures of inducers of nicotinamide quinone oxidoreductase 1 (NQO1). *Methods Enzymol* **382**:423-448.

50. **Dinkova-Kostova, A. T., W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto, and P. Talalay.** 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:11908-11913.
51. **Doble, B. W., and J. R. Woodgett.** 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* **116**:1175-1186.
52. **Dykens, J. A., A. Stern, and E. Trenkner.** 1987. Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. *J Neurochem* **49**:1222-1228.
53. **Eftekharzadeh, B., N. Maghsoudi, and F. Khodagholi.** 2010. Stabilization of transcription factor Nrf2 by tBHQ prevents oxidative stress-induced amyloid beta formation in NT2N neurons. *Biochimie* **92**:245-253.
54. **Eggler, A. L., G. Liu, J. M. Pezzuto, R. B. van Breemen, and A. D. Mesecar.** 2005. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:10070-10075.
55. **Eldar-Finkelman, H., and R. Ilouz.** 2003. Challenges and opportunities with glycogen synthase kinase-3 inhibitors for insulin resistance and Type 2 diabetes treatment. *Expert Opin Investig Drugs* **12**:1511-1519.
56. **Embi, N., D. B. Rylatt, and P. Cohen.** 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* **107**:519-527.
57. **Enomoto, A., K. Itoh, E. Nagayoshi, J. Haruta, T. Kimura, T. O'Connor, T. Harada, and M. Yamamoto.** 2001. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci* **59**:169-177.
58. **Fahey, J. W., A. T. Zalcmann, and P. Talalay.** 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**:5-51.
59. **Favreau, L. V., and C. B. Pickett.** 1993. Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Characterization of a DNA-protein interaction at the antioxidant responsive element and induction by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *J Biol Chem* **268**:19875-19881.
60. **Feldman, R. M., C. C. Correll, K. B. Kaplan, and R. J. Deshaies.** 1997. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**:221-230.
61. **Ferkany, J. W., R. Zaczek, and J. T. Coyle.** 1982. Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature* **298**:757-759.
62. **Floriano-Sanchez, E., C. Villanueva, O. N. Medina-Campos, D. Rocha, D. J. Sanchez-Gonzalez, N. Cardenas-Rodriguez, and J. Pedraza-Chaverri.** 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res* **40**:523-533.
63. **Frescas, D., and M. Pagano.** 2008. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**:438-449.
64. **Fuchs, S. Y., A. Chen, Y. Xiong, Z. Q. Pan, and Z. Ronai.** 1999. HOS, a human homolog of Slimb, forms an SCF complex with Skp1 and Cullin1 and targets the phosphorylation-dependent degradation of IkappaB and beta-catenin. *Oncogene* **18**:2039-2046.

65. **Fuchs, S. Y., V. S. Spiegelman, and K. G. Kumar.** 2004. The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* **23**:2028-2036.
66. **Fujikawa, D. G.** 2000. Confusion between neuronal apoptosis and activation of programmed cell death mechanisms in acute necrotic insults. *Trends Neurosci* **23**:410-411.
67. **Garthwaite, G., and J. Garthwaite.** 1986. Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slices: dependence on calcium concentration. *Neurosci Lett* **66**:193-198.
68. **Glickman, M. H., and A. Ciechanover.** 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**:373-428.
69. **Goodenough, S., S. Conrad, T. Skutella, and C. Behl.** 2004. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  protects against kainic acid-induced neurotoxicity in vivo. *Brain Res* **1026**:116-125.
70. **Guardavaccaro, D., Y. Kudo, J. Boulaire, M. Barchi, L. Busino, M. Donzelli, F. Margottin-Goguet, P. K. Jackson, L. Yamasaki, and M. Pagano.** 2003. Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo. *Dev Cell* **4**:799-812.
71. **Guzman-Beltran, S., S. Espada, M. Orozco-Ibarra, J. Pedraza-Chaverri, and A. Cuadrado.** 2008. Nardihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett* **447**:167-171.
72. **Halkier, B. A., and J. Gershenzon.** 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* **57**:303-333.
73. **Halliwell, B., and J. M. C. Gutteridge.** 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third ed. Clarendon Press, Oxford.
74. **Hamanaka, R. B., and N. S. Chandel.** 2010. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* **35**:505-513.
75. **Hanger, D. P., K. Hughes, J. R. Woodgett, J. P. Brion, and B. H. Anderton.** 1992. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* **147**:58-62.
76. **Hartigan, J. A., W. C. Xiong, and G. V. Johnson.** 2001. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is tyrosine phosphorylated by PYK2. *Biochem Biophys Res Commun* **284**:485-489.
77. **Harwood, A. J.** 2001. Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. *Cell* **105**:821-824.
78. **Hattori, K., S. Hatakeyama, M. Shirane, M. Matsumoto, and K. Nakayama.** 1999. Molecular dissection of the interactions among IkappaB $\alpha$ , FWD1, and Skp1 required for ubiquitin-mediated proteolysis of IkappaB $\alpha$ . *J Biol Chem* **274**:29641-29647.
79. **Hayakawa, M., H. Kitagawa, K. Miyazawa, M. Kitagawa, and K. Kikugawa.** 2005. The FWD1/beta-TrCP-mediated degradation pathway establishes a 'turning off switch' of a Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, FGD1. *Genes Cells* **10**:241-251.
80. **Hayakawa, M., M. Matsushima, H. Hagiwara, T. Oshima, T. Fujino, K. Ando, K. Kikugawa, H. Tanaka, K. Miyazawa, and M. Kitagawa.** 2008. Novel insights into FGD3, a putative GEF for Cdc42, that undergoes SCF(FWD1/beta-TrCP)-mediated proteasomal degradation analogous to that of its homologue FGD1 but regulates cell morphology and motility differently from FGD1. *Genes Cells* **13**:329-342.
81. **Hayes, J. D., and M. McMahon.** 2009. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci* **34**:176-188.

82. **He, N., C. Li, X. Zhang, T. Sheng, S. Chi, K. Chen, Q. Wang, R. Vertrees, R. Logrono, and J. Xie.** 2005. Regulation of lung cancer cell growth and invasiveness by beta-TRCP. *Mol Carcinog* **42**:18-28.
83. **Hoeflich, K. P., J. Luo, E. A. Rubie, M. S. Tsao, O. Jin, and J. R. Woodgett.** 2000. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* **406**:86-90.
84. **Holtzclaw, W. D., A. T. Dinkova-Kostova, and P. Talalay.** 2004. Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Adv Enzyme Regul* **44**:335-367.
85. **Hong, F., M. L. Freeman, and D. C. Liebler.** 2005. Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem Res Toxicol* **18**:1917-1926.
86. **Hong, F., K. R. Sekhar, M. L. Freeman, and D. C. Liebler.** 2005. Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation. *J Biol Chem* **280**:31768-31775.
87. **Hongisto, V., J. C. Vainio, R. Thompson, M. J. Courtney, and E. T. Coffey.** 2008. The Wnt pool of glycogen synthase kinase 3beta is critical for trophic-deprivation-induced neuronal death. *Mol Cell Biol* **28**:1515-1527.
88. **Huang, H. C., T. Nguyen, and C. B. Pickett.** 2002. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* **277**:42769-42774.
89. **Huang, H. C., T. Nguyen, and C. B. Pickett.** 2000. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12475-12480.
90. **Huibregtse, J. M., M. Scheffner, S. Beaudenon, and P. M. Howley.** 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5249.
91. **Hwang, T. L., and A. J. Shaka.** 1995. Water Suppression That Works - Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J Magn Reson* **112**:275-279.
92. **Innamorato, N. G., A. Jazwa, A. I. Rojo, C. Garcia, J. Fernandez-Ruiz, A. Grochot-Przeczek, A. Stachurska, A. Jozkowicz, J. Dulak, and A. Cuadrado.** 2010. Different susceptibility to the Parkinson's toxin MPTP in mice lacking the redox master regulator Nrf2 or its target gene heme oxygenase-1. *PLoS One* **5**:e11838.
93. **Innamorato, N. G., A. I. Rojo, A. J. Garcia-Yague, M. Yamamoto, M. L. de Ceballos, and A. Cuadrado.** 2008. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J Immunol* **181**:680-689.
94. **Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto, and Y. Nabeshima.** 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **236**:313-322.
95. **Itoh, K., K. Igarashi, N. Hayashi, M. Nishizawa, and M. Yamamoto.** 1995. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol Cell Biol* **15**:4184-4193.
96. **Itoh, K., T. Ishii, N. Wakabayashi, and M. Yamamoto.** 1999. Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic Res* **31**:319-324.
97. **Itoh, K., J. Mimura, and M. Yamamoto.** 2010. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid Redox Signal* **13**:1665-1678.
98. **Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel, and M. Yamamoto.** 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* **13**:76-86.

99. **Jaakkola, P., D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe.** 2001. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**:468-472.
100. **Jain, A. K., and A. K. Jaiswal.** 2007. GSK-3 $\beta$  acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem* **282**:16502-16510.
101. **Jain, A. K., and A. K. Jaiswal.** 2006. Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J Biol Chem* **281**:12132-12142.
102. **Jakoby, W. B., and D. M. Ziegler.** 1990. The enzymes of detoxication. *J Biol Chem* **265**:20715-20718.
103. **Jaworski, T., I. Dewachter, B. Lechat, M. Gees, A. Kremer, D. Demedts, P. Borghgraef, H. Devijver, S. Kugler, S. Patel, J. R. Woodgett, and F. Van Leuven.** 2011. GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  kinases and amyloid production in vivo. *Nature* **480**:E4-5; discussion E6.
104. **Jazwa, A., A. I. Rojo, N. G. Innamorato, M. Hesse, J. Fernandez-Ruiz, and A. Cuadrado.** 2011. Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism. *Antioxid Redox Signal* **14**:2347-2360.
105. **Jin, W., J. Kong, H. Wang, J. Wu, T. Lu, J. Jiang, H. Ni, and W. Liang.** 2011. Protective effect of tert-butylhydroquinone on cerebral inflammatory response following traumatic brain injury in mice. *Injury* **42**:714-718.
106. **Jin, W., H. Ni, Y. Dai, H. Wang, T. Lu, J. Wu, J. Jiang, and W. Liang.** 2010. Effects of tert-butylhydroquinone on intestinal inflammatory response and apoptosis following traumatic brain injury in mice. *Mediators Inflamm* **2010**:502564.
107. **Joazeiro, C. A., and A. M. Weissman.** 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**:549-552.
108. **Kanemori, Y., K. Uto, and N. Sagata.** 2005. Beta-TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:6279-6284.
109. **Kang, K. W., S. J. Lee, and S. G. Kim.** 2005. Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **7**:1664-1673.
110. **Kang, K. W., S. J. Lee, J. W. Park, and S. G. Kim.** 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol Pharmacol* **62**:1001-1010.
111. **Kang, T., Y. Wei, Y. Honaker, H. Yamaguchi, E. Appella, M. C. Hung, and H. Piwnicka-Worms.** 2008. GSK-3  $\beta$  targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3  $\beta$  inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer Cell* **13**:36-47.
112. **Katoh, Y., K. Itoh, E. Yoshida, M. Miyagishi, A. Fukamizu, and M. Yamamoto.** 2001. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* **6**:857-868.
113. **Katsuoka, F., H. Motohashi, J. D. Engel, and M. Yamamoto.** 2005. Nrf2 transcriptionally activates the mafG gene through an antioxidant response element. *J Biol Chem* **280**:4483-4490.
114. **Keum, Y. S., E. D. Owuor, B. R. Kim, R. Hu, and A. N. Kong.** 2003. Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Pharm Res* **20**:1351-1356.
115. **Khodagholi, F., and S. K. Tusi.** 2011. Stabilization of Nrf2 by tBHQ prevents LPS-induced apoptosis in differentiated PC12 cells. *Mol Cell Biochem* **354**:97-112.
116. **Kim, A. N., W. K. Jeon, J. J. Lee, and B. C. Kim.** 2010. Up-regulation of heme oxygenase-1 expression through CaMKII-ERK1/2-Nrf2 signaling mediates the anti-



- inflammatory effect of bisdemethoxycurcumin in LPS-stimulated macrophages. *Free Radic Biol Med* **49**:323-331.
117. **Kim, C. J., J. H. Song, Y. G. Cho, Y. S. Kim, S. Y. Kim, S. W. Nam, N. J. Yoo, J. Y. Lee, and W. S. Park.** 2007. Somatic mutations of the beta-TrCP gene in gastric cancer. *APMIS* **115**:127-133.
  118. **Kim, D. W., J. H. Lee, S. K. Park, W. M. Yang, G. S. Jeon, Y. H. Lee, C. K. Chung, and S. S. Cho.** 2007. Astrocytic expressions of phosphorylated Akt, GSK3beta and CREB following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus. *Neurochem Res* **32**:1460-1468.
  119. **Kim, L., A. Harwood, and A. R. Kimmel.** 2002. Receptor-dependent and tyrosine phosphatase-mediated inhibition of GSK3 regulates cell fate choice. *Dev Cell* **3**:523-532.
  120. **Kim, Y. R., J. E. Oh, M. S. Kim, M. R. Kang, S. W. Park, J. Y. Han, H. S. Eom, N. J. Yoo, and S. H. Lee.** 2010. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol* **220**:446-451.
  121. **Kobayashi, A., E. Ito, T. Toki, K. Kogame, S. Takahashi, K. Igarashi, N. Hayashi, and M. Yamamoto.** 1999. Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n' collar family transcription factor Nrf3. *J Biol Chem* **274**:6443-6452.
  122. **Kobayashi, A., M. I. Kang, H. Okawa, M. Ohtsuji, Y. Zenke, T. Chiba, K. Igarashi, and M. Yamamoto.** 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24**:7130-7139.
  123. **Kockeritz, L., B. Doble, S. Patel, and J. R. Woodgett.** 2006. Glycogen synthase kinase-3--an overview of an over-achieving protein kinase. *Curr Drug Targets* **7**:1377-1388.
  124. **Koike, J., N. Sagara, H. Kirikoshi, A. Takagi, T. Miwa, M. Hirai, and M. Katoh.** 2000. Molecular cloning and genomic structure of the betaTRCP2 gene on chromosome 5q35.1. *Biochem Biophys Res Commun* **269**:103-109.
  125. **Kraft, A. D., J. M. Lee, D. A. Johnson, Y. W. Kan, and J. A. Johnson.** 2006. Neuronal sensitivity to kainic acid is dependent on the Nrf2-mediated actions of the antioxidant response element. *J Neurochem* **98**:1852-1865.
  126. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
  127. **Latres, E., D. S. Chiaur, and M. Pagano.** 1999. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* **18**:849-854.
  128. **Lee, J. M., J. M. Hanson, W. A. Chu, and J. A. Johnson.** 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **276**:20011-20016.
  129. **Lesort, M., R. S. Jope, and G. V. Johnson.** 1999. Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase. *J Neurochem* **72**:576-584.
  130. **Li, X., J. Liu, and T. Gao.** 2009. beta-TrCP-mediated ubiquitination and degradation of PHLPP1 are negatively regulated by Akt. *Mol Cell Biol* **29**:6192-6205.
  131. **Liang, Q., H. Qian, and W. Yao.** 2005. Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* **11**:93-101.
  132. **Limon-Mortes, M. C., M. Mora-Santos, A. Espina, J. A. Pintor-Toro, A. Lopez-Roman, M. Tortolero, and F. Romero.** 2008. UV-induced degradation of securin is mediated by SKP1-CUL1-beta TrCP E3 ubiquitin ligase. *J Cell Sci* **121**:1825-1831.

133. **Lin, W., R. T. Wu, T. Wu, T. O. Khor, H. Wang, and A. N. Kong.** 2008. Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. *Biochem Pharmacol* **76**:967-973.
134. **Linge, J. P., M. Habeck, W. Rieping, and M. Nilges.** 2003. ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* **19**:315-316.
135. **Liu, W., R. Liu, J. T. Chun, R. Bi, W. Hoe, S. S. Schreiber, and M. Baudry.** 2001. Kainate excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures: evidence for multiple apoptotic pathways. *Brain Res* **916**:239-248.
136. **Lochhead, P. A., R. Kinstrie, G. Sibbet, T. Rawjee, N. Morrice, and V. Cleghon.** 2006. A chaperone-dependent GSK3 $\beta$  transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation. *Mol Cell* **24**:627-633.
137. **Margottin, F., S. P. Bour, H. Durand, L. Selig, S. Benichou, V. Richard, D. Thomas, K. Strebel, and R. Benarous.** 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* **1**:565-574.
138. **Marini, M. G., K. Chan, L. Casula, Y. W. Kan, A. Cao, and P. Moi.** 1997. hMAF, a small human transcription factor that heterodimerizes specifically with Nrf1 and Nrf2. *J Biol Chem* **272**:16490-16497.
139. **Marinissen, M. J., T. Tanos, M. Bolos, M. R. de Sagarra, O. A. Coso, and A. Cuadrado.** 2006. Inhibition of heme oxygenase-1 interferes with the transforming activity of the Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **281**:11332-11346.
140. **Martin, D., A. I. Rojo, M. Salinas, R. Diaz, G. Gallardo, J. Alam, C. M. De Galarreta, and A. Cuadrado.** 2004. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem* **279**:8919-8929.
141. **Martin, D., M. Salinas, N. Fujita, T. Tsuruo, and A. Cuadrado.** 2002. Ceramide and reactive oxygen species generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce caspase-3-independent degradation of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem* **277**:42943-42952.
142. **Martin, D., M. Salinas, R. Lopez-Valdaliso, E. Serrano, M. Recuero, and A. Cuadrado.** 2001. Effect of the Alzheimer amyloid fragment A $\beta$ (25-35) on Akt/PKB kinase and survival of PC12 cells. *J Neurochem* **78**:1000-1008.
143. **McMahon, M., K. Itoh, M. Yamamoto, S. A. Chanas, C. J. Henderson, L. I. McLellan, C. R. Wolf, C. Cavin, and J. D. Hayes.** 2001. The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res* **61**:3299-3307.
144. **McMahon, M., N. Thomas, K. Itoh, M. Yamamoto, and J. D. Hayes.** 2006. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem* **281**:24756-24768.
145. **McMahon, M., N. Thomas, K. Itoh, M. Yamamoto, and J. D. Hayes.** 2004. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem* **279**:31556-31567.
146. **Megy, S., G. Bertho, J. Gharbi-Benarous, N. Evrard-Todeschi, G. Coadou, E. Segéral, C. Iehle, E. Quemeneur, R. Benarous, and J. P. Girault.** 2005. STD and TRNOESY NMR studies on the conformation of the oncogenic protein beta-catenin containing the phosphorylated motif DpSGXXpS bound to the beta-TrCP protein. *J Biol Chem* **280**:29107-29116.
147. **Meyer, L., B. Deau, H. Forejtnikova, D. Dumenil, F. Margottin-Goguët, C. Lacombe, P. Mayeux, and F. Verdier.** 2007. beta-Trcp mediates ubiquitination

- and degradation of the erythropoietin receptor and controls cell proliferation. *Blood* **109**:5215-5222.
148. **Moi, P., K. Chan, I. Asunis, A. Cao, and Y. W. Kan.** 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9926-9930.
  149. **Mukai, F., K. Ishiguro, Y. Sano, and S. C. Fujita.** 2002. Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem* **81**:1073-1083.
  150. **Muyllaert, D., A. Kremer, T. Jaworski, P. Borghgraef, H. Devijver, S. Croes, I. Dewachter, and F. Van Leuven.** 2008. Glycogen synthase kinase-3beta, or a link between amyloid and tau pathology? *Genes Brain Behav* **7 Suppl 1**:57-66.
  151. **Nakashima, H., T. Ishihara, P. Suguimoto, O. Yokota, E. Oshima, A. Kugo, S. Terada, T. Hamamura, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, and S. Kuroda.** 2005. Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathol* **110**:547-556.
  152. **Nakata, K., Y. Tanaka, T. Nakano, T. Adachi, H. Tanaka, T. Kaminuma, and T. Ishikawa.** 2006. Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet* **21**:437-457.
  153. **Nakayama, K., S. Hatakeyama, S. Maruyama, A. Kikuchi, K. Onoe, R. A. Good, and K. I. Nakayama.** 2003. Impaired degradation of inhibitory subunit of NF-kappa B (I kappa B) and beta-catenin as a result of targeted disruption of the beta-TrCP1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8752-8757.
  154. **Nguyen, T., T. H. Rushmore, and C. B. Pickett.** 1994. Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene. Analysis of the antioxidant response element and its activation by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Biol Chem* **269**:13656-13662.
  155. **Nicholls, D. G., and S. L. Budd.** 1998. Neuronal excitotoxicity: the role of mitochondria. *Biofactors* **8**:287-299.
  156. **Nioi, P., T. Nguyen, P. J. Sherratt, and C. B. Pickett.** 2005. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **25**:10895-10906.
  157. **Niture, S. K., A. K. Jain, and A. K. Jaiswal.** 2009. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci* **122**:4452-4464.
  158. **Niture, S. K., A. K. Jain, P. M. Shelton, and A. K. Jaiswal.** 2011. Src subfamily kinases regulate nuclear export and degradation of transcription factor Nrf2 to switch off Nrf2-mediated antioxidant activation of cytoprotective gene expression. *J Biol Chem* **286**:28821-28832.
  159. **Noble, W., E. Planel, C. Zehr, V. Olm, J. Meyerson, F. Suleman, K. Gaynor, L. Wang, J. LaFrancois, B. Feinstein, M. Burns, P. Krishnamurthy, Y. Wen, R. Bhat, J. Lewis, D. Dickson, and K. Duff.** 2005. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:6990-6995.
  160. **Nouhi, F., S. K. Tusi, A. Abdi, and F. Khodagholi.** 2011. Dietary supplementation with tBHQ, an Nrf2 stabilizer molecule, confers neuroprotection against apoptosis in amyloid beta-injected rat. *Neurochem Res* **36**:870-878.
  161. **Okabe, H., S. H. Lee, J. Phuchareon, D. G. Albertson, F. McCormick, and O. Tetsu.** 2006. A critical role for FBXW8 and MAPK in cyclin D1 degradation and cancer cell proliferation. *PLoS One* **1**:e128.
  162. **Padmanabhan, B., K. I. Tong, T. Ohta, Y. Nakamura, M. Scharlock, M. Ohtsuji, M. I. Kang, A. Kobayashi, S. Yokoyama, and M. Yamamoto.** 2006. Structural



- basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* **21**:689-700.
163. **Pan, Y., C. B. Bai, A. L. Joyner, and B. Wang.** 2006. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol* **26**:3365-3377.
  164. **Papkoff, J., and M. Aikawa.** 1998. WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **247**:851-858.
  165. **Petroski, M. D., and R. J. Deshaies.** 2005. In vitro reconstitution of SCF substrate ubiquitination with purified proteins. *Methods Enzymol* **398**:143-158.
  166. **Phiel, C. J., C. A. Wilson, V. M. Lee, and P. S. Klein.** 2003. GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* **423**:435-439.
  167. **Pi, J., Y. Bai, J. M. Reece, J. Williams, D. Liu, M. L. Freeman, W. E. Fahl, D. Shugar, J. Liu, W. Qu, S. Collins, and M. P. Waalkes.** 2007. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med* **42**:1797-1806.
  168. **Pickart, C. M.** 2004. Back to the future with ubiquitin. *Cell* **116**:181-190.
  169. **Ping, Z., W. Liu, Z. Kang, J. Cai, Q. Wang, N. Cheng, S. Wang, J. H. Zhang, and X. Sun.** 2010. Sulforaphane protects brains against hypoxic-ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Brain Res* **1343**:178-185.
  170. **Piotto, M., V. Saudek, and V. Sklenar.** 1992. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* **2**:661-665.
  171. **Pitha-Rowe, I., K. Liby, D. Royce, and M. Sporn.** 2009. Synthetic triterpenoids attenuate cytotoxic retinal injury: cross-talk between Nrf2 and PI3K/AKT signaling through inhibition of the lipid phosphatase PTEN. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**:5339-5347.
  172. **Pons, J., N. Evrard-Todeschi, G. Bertho, J. Gharbi-Benarous, V. Sonois, R. Benarous, and J. P. Girault.** 2007. Structural studies on 24P-IkappaBalpha peptide derived from a human IkappaB-alpha protein related to the inhibition of the activity of the transcription factor NF-kappaB. *Biochemistry* **46**:2958-2972.
  173. **Pons, J., N. Evrard-Todeschi, G. Bertho, J. Gharbi-Benarous, V. Tanchou, R. Benarous, and J. P. Girault.** 2008. Transfer-NMR and docking studies identify the binding of the peptide derived from activating transcription factor 4 to protein ubiquitin ligase beta-TrCP. Competition STD-NMR with beta-catenin. *Biochemistry* **47**:14-29.
  174. **Pons, J., V. Tanchou, J. P. Girault, G. Bertho, and N. Evrard-Todeschi.** 2011. NMR applications for identifying beta-TrCP protein-ligand interactions. *Mini Rev Med Chem* **11**:283-297.
  175. **Prochaska, H. J., H. S. Bregman, M. J. De Long, and P. Talalay.** 1985. Specificity of induction of cancer protective enzymes by analogues of tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA). *Biochem Pharmacol* **34**:3909-3914.
  176. **Prochaska, H. J., M. J. De Long, and P. Talalay.** 1985. On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: a unifying proposal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:8232-8236.
  177. **Puttfarcken, P. S., R. L. Getz, and J. T. Coyle.** 1993. Kainic acid-induced lipid peroxidation: protection with butylated hydroxytoluene and U78517F in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res* **624**:223-232.
  178. **Ramos-Gomez, M., M. K. Kwak, P. M. Dolan, K. Itoh, M. Yamamoto, P. Talalay, and T. W. Kensler.** 2001. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:3410-3415.
  179. **Rangasamy, T., C. Y. Cho, R. K. Thimmulappa, L. Zhen, S. S. Srisuma, T. W. Kensler, M. Yamamoto, I. Petrache, R. M. Tudor, and S. Biswal.** 2004. Genetic

- ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* **114**:1248-1259.
180. **Rojo, A. I., M. R. Sagarra, and A. Cuadrado.** 2008. GSK-3 $\beta$  down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem* **105**:192-202.
  181. **Rushmore, T. H., M. R. Morton, and C. B. Pickett.** 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* **266**:11632-11639.
  182. **Rushmore, T. H., and C. B. Pickett.** 1990. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* **265**:14648-14653.
  183. **Sakamoto, K., K. Iwasaki, H. Sugiyama, and Y. Tsuji.** 2009. Role of the tumor suppressor PTEN in antioxidant responsive element-mediated transcription and associated histone modifications. *Mol Biol Cell* **20**:1606-1617.
  184. **Salazar, M., A. I. Rojo, D. Velasco, R. M. de Sagarra, and A. Cuadrado.** 2006. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* **281**:14841-14851.
  185. **Salinas, M., R. Diaz, N. G. Abraham, C. M. Ruiz de Galarreta, and A. Cuadrado.** 2003. Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J Biol Chem* **278**:13898-13904.
  186. **Sambrook, J., and E. F. Fritsch (ed.).** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
  187. **Sayas, C. L., M. T. Moreno-Flores, J. Avila, and F. Wandsell.** 1999. The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. *J Biol Chem* **274**:37046-37052.
  188. **Schulman, B. A., A. C. Carrano, P. D. Jeffrey, Z. Bowen, E. R. Kinnucan, M. S. Finnin, S. J. Elledge, J. W. Harper, M. Pagano, and N. P. Pavletich.** 2000. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* **408**:381-386.
  189. **Schulz, J. B., D. R. Henshaw, D. Siwek, B. G. Jenkins, R. J. Ferrante, P. B. Cipolloni, N. W. Kowall, B. R. Rosen, and M. F. Beal.** 1995. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem* **64**:2239-2247.
  190. **Schwarzinger, S., G. J. Kroon, T. R. Foss, J. Chung, P. E. Wright, and H. J. Dyson.** 2001. Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts. *J Am Chem Soc* **123**:2970-2978.
  191. **Sen, A., M. Thom, L. Martinian, B. Harding, J. H. Cross, M. Nikolic, and S. M. Sisodiya.** 2007. Pathological tau tangles localize to focal cortical dysplasia in older patients. *Epilepsia* **48**:1447-1454.
  192. **Shen, G., V. Hebbar, S. Nair, C. Xu, W. Li, W. Lin, Y. S. Keum, J. Han, M. A. Gallo, and A. N. Kong.** 2004. Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. The differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of Raf and CREB-binding protein. *J Biol Chem* **279**:23052-23060.
  193. **Shlomai, J.** 2010. Redox control of protein-DNA interactions: from molecular mechanisms to significance in signal transduction, gene expression, and DNA replication. *Antioxid Redox Signal* **13**:1429-1476.
  194. **Singh, A., S. Boldin-Adamsky, R. K. Thimmulappa, S. K. Rath, H. Ashush, J. Coulter, A. Blackford, S. N. Goodman, F. Bunz, W. H. Watson, E. Gabrielson, E. Feinstein, and S. Biswal.** 2008. RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res* **68**:7975-7984.

195. **Skowyra, D., K. L. Craig, M. Tyers, S. J. Elledge, and J. W. Harper.** 1997. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**:209-219.
196. **Smirnova, N. A., R. E. Haskew-Layton, M. Basso, D. M. Hushpulian, J. B. Payappilly, R. E. Speer, Y. H. Ahn, I. Rakhman, P. A. Cole, J. T. Pinto, R. R. Ratan, and I. G. Gazaryan.** 2011. Development of Neh2-luciferase reporter and its application for high throughput screening and real-time monitoring of Nrf2 activators. *Chem Biol* **18**:752-765.
197. **States, D. J., R. A. Haberkorn, and D. J. Ruben.** 1982. A two-dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J Magn Reson* **48**:286-292.
198. **Stoothoff, W. H., J. H. Cho, R. P. McDonald, and G. V. Johnson.** 2005. FRAT-2 preferentially increases glycogen synthase kinase 3 beta-mediated phosphorylation of primed sites, which results in enhanced tau phosphorylation. *J Biol Chem* **280**:270-276.
199. **Su, Y., J. Ryder, B. Li, X. Wu, N. Fox, P. Solenberg, K. Brune, S. Paul, Y. Zhou, F. Liu, and B. Ni.** 2004. Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry* **43**:6899-6908.
200. **Sun, Z., Z. Huang, and D. D. Zhang.** 2009. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One* **4**:e6588.
201. **Sutherland, C.** 2011. What Are the bona fide GSK3 Substrates? *Int J Alzheimers Dis* **2011**:505607.
202. **Suzuki, H., T. Chiba, M. Kobayashi, M. Takeuchi, K. Furuichi, and K. Tanaka.** 1999. In vivo and in vitro recruitment of an IkappaBalpha-ubiquitin ligase to IkappaBalpha phosphorylated by IKK, leading to ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* **256**:121-126.
203. **Sykiotis, G. P., and D. Bohmann.** 2010. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal* **3**:re3.
204. **Taelman, V. F., R. Dobrowolski, J. L. Plouhinec, L. C. Fuentealba, P. P. Vorwald, I. Gumper, D. D. Sabatini, and E. M. De Robertis.** 2010. Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* **143**:1136-1148.
205. **Takashima, A., K. Noguchi, G. Michel, M. Mercken, M. Hoshi, K. Ishiguro, and K. Imahori.** 1996. Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett* **203**:33-36.
206. **Tang, W., Y. Li, D. Yu, A. Thomas-Tikhonenko, V. S. Spiegelman, and S. Y. Fuchs.** 2005. Targeting beta-transducin repeat-containing protein E3 ubiquitin ligase augments the effects of antitumor drugs on breast cancer cells. *Cancer Res* **65**:1904-1908.
207. **Thornton, T. M., G. Pedraza-Alva, B. Deng, C. D. Wood, A. Aronshtam, J. L. Clements, G. Sabio, R. J. Davis, D. E. Matthews, B. Doble, and M. Rincon.** 2008. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* **320**:667-670.
208. **Tong, K. I., A. Kobayashi, F. Katsuoka, and M. Yamamoto.** 2006. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem* **387**:1311-1320.
209. **Tong, K. I., B. Padmanabhan, A. Kobayashi, C. Shang, Y. Hirotsu, S. Yokoyama, and M. Yamamoto.** 2007. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol* **27**:7511-7521.
210. **Treier, M., L. M. Staszewski, and D. Bohmann.** 1994. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* **78**:787-798.

211. **Venugopal, R., and A. K. Jaiswal.** 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:14960-14965.
212. **Villeneuve, N. F., A. Lau, and D. D. Zhang.** 2010. Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxid Redox Signal* **13**:1699-1712.
213. **Wakabayashi, N., A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, M. I. Kang, A. Kobayashi, M. Yamamoto, T. W. Kensler, and P. Talalay.** 2004. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2040-2045.
214. **Wang, B., and Y. Li.** 2006. Evidence for the direct involvement of {beta}TrCP in Gli3 protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:33-38.
215. **Watanabe, N., H. Arai, Y. Nishihara, M. Taniguchi, T. Hunter, and H. Osada.** 2004. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:4419-4424.
216. **West, J. D., and L. J. Marnett.** 2006. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem Res Toxicol* **19**:173-194.
217. **Willker, W., D. Leibfritz, R. Kerssebaum, and W. Bermel.** 1993. Gradient Selection in Inverse Heteronuclear Correlation Spectroscopy. *Magn Reson Chem* **31**: 287-292.
218. **Winston, J. T., D. M. Koepp, C. Zhu, S. J. Elledge, and J. W. Harper.** 1999. A family of mammalian F-box proteins. *Curr Biol* **9**:1180-1182.
219. **Wood-Kaczmar, A., M. Kraus, K. Ishiguro, K. L. Philpott, and P. R. Gordon-Weeks.** 2009. An alternatively spliced form of glycogen synthase kinase-3beta is targeted to growing neurites and growth cones. *Mol Cell Neurosci* **42**:184-194.
220. **Woodgett, J. R.** 1991. cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3. *Methods Enzymol* **200**:564-577.
221. **Woodgett, J. R.** 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* **9**:2431-2438.
222. **Wu, G., G. Xu, B. A. Schulman, P. D. Jeffrey, J. W. Harper, and N. P. Pavletich.** 2003. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell* **11**:1445-1456.
223. **Wüthrich, K.** 1986. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons, New York.
224. **Xu, C., N. G. Kim, and B. M. Gumbiner.** 2009. Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation. *Cell Cycle* **8**:4032-4039.
225. **Xu, C., X. Yuan, Z. Pan, G. Shen, J. H. Kim, S. Yu, T. O. Khor, W. Li, J. Ma, and A. N. Kong.** 2006. Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Mol Cancer Ther* **5**:1918-1926.
226. **Yam-Canul, P., Y. I. Chirino, D. J. Sanchez-Gonzalez, C. M. Martinez-Martinez, C. Cruz, C. Villanueva, and J. Pedraza-Chaverri.** 2008. Nordihydroguaiaretic acid attenuates potassium dichromate-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol* **46**:1089-1096.
227. **Yamamoto, T., T. Suzuki, A. Kobayashi, J. Wakabayashi, J. Maher, H. Motohashi, and M. Yamamoto.** 2008. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol Cell Biol* **28**:2758-2770.
228. **Yaron, A., H. Gonen, I. Alkalay, A. Hatzubai, S. Jung, S. Beyth, F. Mercurio, A. M. Manning, A. Ciechanover, and Y. Ben-Neriah.** 1997. Inhibition of NF-kappa-B

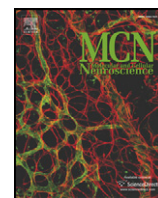
- cellular function via specific targeting of the I-kappa-B-ubiquitin ligase. *EMBO J* **16**:6486-6494.
229. **Yaron, A., A. Hatzubai, M. Davis, I. Lavon, S. Amit, A. M. Manning, J. S. Andersen, M. Mann, F. Mercurio, and Y. Ben-Neriah.** 1998. Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature* **396**:590-594.
  230. **Yoshida, S., M. Maeda, S. Kaku, H. Ikeya, K. Yamada, and S. Nakaike.** 2006. Lithium inhibits stress-induced changes in tau phosphorylation in the mouse hippocampus. *J Neural Transm* **113**:1803-1814.
  231. **Yost, C., G. H. Farr, 3rd, S. B. Pierce, D. M. Ferkey, M. M. Chen, and D. Kimelman.** 1998. GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in *Xenopus* development and oncogenesis. *Cell* **93**:1031-1041.
  232. **Yu, R., W. Lei, S. Mandlekar, M. J. Weber, C. J. Der, J. Wu, and A. N. Kong.** 1999. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem* **274**:27545-27552.
  233. **Zhang, D. D., and M. Hannink.** 2003. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* **23**:8137-8151.
  234. **Zhang, D. D., S. C. Lo, J. V. Cross, D. J. Templeton, and M. Hannink.** 2004. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* **24**:10941-10953.
  235. **Zhang, J., N. Zheng, and P. Zhou.** 2003. Exploring the functional complexity of cellular proteins by protein knockout. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:14127-14132.
  236. **Zhang, Y., P. Talalay, C. G. Cho, and G. H. Posner.** 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:2399-2403.
  237. **Zhao, B., L. Li, K. Tumaneng, C. Y. Wang, and K. L. Guan.** 2010. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev* **24**:72-85.
  238. **Zhao, H. D., F. Zhang, G. Shen, Y. B. Li, Y. H. Li, H. R. Jing, L. F. Ma, J. H. Yao, and X. F. Tian.** 2010. Sulforaphane protects liver injury induced by intestinal ischemia reperfusion through Nrf2-ARE pathway. *World J Gastroenterol* **16**:3002-3010.
  239. **Zheng, N., B. A. Schulman, L. Song, J. J. Miller, P. D. Jeffrey, P. Wang, C. Chu, D. M. Koepp, S. J. Elledge, M. Pagano, R. C. Conaway, J. W. Conaway, J. W. Harper, and N. P. Pavletich.** 2002. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**:703-709.
  240. **Zhou, B. P., J. Deng, W. Xia, J. Xu, Y. M. Li, M. Gunduz, and M. C. Hung.** 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* **6**:931-940.
  241. **Zhu, Z., and M. Kirschner.** 2002. Regulated proteolysis of Xom mediates dorsoventral pattern formation during early *Xenopus* development. *Dev Cell* **3**:557-568.
  242. **Zipper, L. M., and R. T. Mulcahy.** 2003. Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells. *Toxicol Sci* **73**:124-134.



## ***ANEXOS***







## Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal cell death

Ana I. Rojo<sup>a</sup>, Patricia Rada<sup>a</sup>, Javier Egea<sup>b</sup>, Angelo O. Rosa<sup>b</sup>, Manuela G. López<sup>b</sup>, Antonio Cuadrado<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” UAM-CSIC, Departamento de Bioquímica, and Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 March 2008

Revised 19 May 2008

Accepted 10 June 2008

Available online 20 June 2008

#### Keywords:

Nrf2

GSK-3beta

Kainate

Excitotoxicity

Sulforaphane

Oxidative stress

### ABSTRACT

Excitotoxicity mediated by glutamate receptors may underlay the pathology of several neurologic diseases. Considering that oxidative stress is central to excitotoxic damage, in this study we sought to analyze if the transcription factor Nrf2, guardian of redox homeostasis, might be targeted to prevent kainate-induced neuron death. Hippocampal slices from Nrf2 knockout mice exhibited increased oxidative stress and cell death compared to those of control mice in response to kainate, as determined with the redox sensitive probes 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFAC) and propidium iodide and lactate dehydrogenase release, respectively, therefore demonstrating a role of Nrf2 in antioxidant protection against excitotoxicity. In the hippocampus of mice intraperitoneally injected with kainate we observed a rapid activation of Akt, inhibition of GSK-3β and translocation of Nrf2 to the nucleus, but after 4 h Akt was inactive, GSK-3β was active and Nrf2 was mostly cytosolic, therefore extending our previous studies which indicate that GSK-3β excludes Nrf2 from the nucleus. Lithium, a GSK-3β inhibitor, promoted Nrf2 transcriptional activity towards an Antioxidant-Response-Element (ARE) luciferase reporter and cooperated with sulforaphane (SFN) to induce this reporter and to increase the protein levels of heme oxygenase-1 (HO-1), coded by a representative ARE-containing gene. Conversely, ARE activation by SFN was attenuated by over-expression of active GSK-3β. Finally, combined treatment with SFN and lithium attenuated oxidative stress and cell death in kainate-treated hippocampal slices of wild type mice but not Nrf2 null littermates. Our findings identify the axis GSK-3β/Nrf2 as a pharmacological target in prevention of excitotoxic neuronal death.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Kainic acid has been frequently used to analyze the mechanisms of neuronal death induced by excitotoxicity. This compound efficiently crosses the blood brain barrier and promotes hippocampal alterations that resemble those of human temporal lobe epilepsy, including seizure and neuronal CA3 loss (Ben-Ari, 1981). Kainate-induced alterations are produced by the activation of non-NMDA glutamate receptors in the presynaptic neuron, followed by endogenous glutamate release (Ferkany et al., 1982), activation of postsynaptic voltage dependent channels (Garthwaite and Garthwaite, 1986) and calcium entry (Nicholls and Budd, 1998; Fujikawa, 2000; Liu et al., 2001).

Central to kainate-induced neurotoxicity is the massive generation of reactive oxygen species (ROS) leading to apoptotic and necrotic cell death (Dykens et al., 1987; Puttfarcken et al., 1993; Schulz et al., 1995).

Neurons submitted to kainate up-regulate the expression of antioxidant phase II enzymes such as heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 (NQO1) or metallothionein in an effort to maintain redox homeostasis (Emerson et al., 2000; Stringer et al., 2004; Huang et al., 2005; Kraft et al., 2006). Indeed, mice deficient in NQO1 or metallothionein are more sensitive to kainate than control mice (Carrasco et al., 2000) and rats submitted to Sn-protoporphyrin, a heme oxygenase inhibitor, display exacerbated kainate neurotoxicity. Kainate also promotes iron and bilirubin release in hippocampus (Huang et al., 2005). Altogether, these evidences highlight the relevant function of antioxidant phase II defense in this epileptic model.

Antioxidant phase II genes are regulated through the Antioxidant-Response-Elements (ARE) by the transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2) (Kensler et al., 2007). Nrf2 is regulated by mechanisms that include protein stability and subcellular localization (Katsuoka et al., 2005). Protein stability is dependent on the interaction of Nrf2 with the BTB-Kelch protein Keap1 that promotes Nrf2 degradation by the proteasome (Lo et al., 2006; Tong et al., 2006). Physiological or pharmacological stimuli, including the aliphatic isothiocyanate sulforaphane (SFN), promote the dissociation of the Nrf2–Keap1 complex

\* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UAM, C/ Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain. Fax: +3491 585 4401.

E-mail address: [antonio.cuadrado@uam.es](mailto:antonio.cuadrado@uam.es) (A. Cuadrado).

resulting in stabilization of Nrf2 (Katsuoka et al., 2005; Dinkova-Kostova et al., 2002). On the other hand, Nrf2 exhibits a cytoplasmic/nuclear shuttling cycle that is submitted to tight regulation (Lee et al., 2007). In resting unstimulated cells, Nrf2 is located in the cytosol but proper stimuli not only dissociate Nrf2 from Keap1 but also promote its nuclear accumulation. Shutting down the Nrf2 response back to the resting state requires its nuclear exit and proteasomal degradation.

The intracellular signalling events associated with kainate-induced excitotoxicity are poorly understood but recent studies implicate activation of the Ser/Thr protein kinase GSK-3 $\beta$  (Goodenough et al., 2004; Busceti et al., 2007; Kim et al., 2007). Contrary to most signalling kinases, GSK-3 $\beta$  is active in unstimulated cells and sensitizes cells to death-promoting insults. Growth factors and neurotrophins activate signalling kinases, including Akt, ERK and PKC, which may phosphorylate GSK-3 $\beta$  at Ser9 leading to its inactivation and reinforcement of cell survival (Woodgett 1994; Cross et al., 1995). Despite these evidences it is not known which and how GSK-3 $\beta$  substrates participate in the activation of cell death programs. An emerging possibility is that GSK-3 $\beta$  phosphorylates and inhibits several transcription factors involved in vital metabolic processes (Bijur et al., 2000; Bournat et al., 2000; Walton and Dragunow 2000; Grimes and Jope 2001).

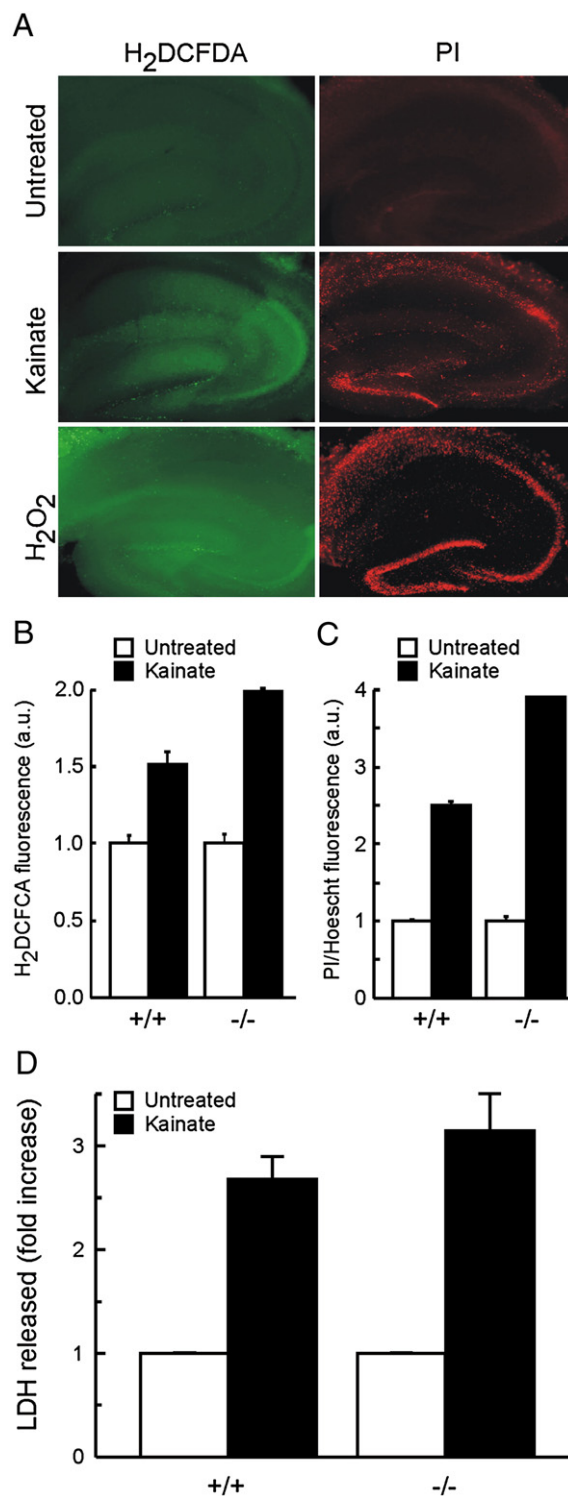
In previous studies, we have described a role of GSK-3 $\beta$  in the nuclear exclusion and inactivation of Nrf2, resulting in sensitization of neurons to oxidative damage. In fact, this may be one mechanism whereby GSK-3 $\beta$  is proapoptotic in neurons (Salazar et al., 2006; Rojo et al., 2007). Consistent with this hypothesis, GSK-3 $\beta$  inhibition by lithium prevents kainate-induced hippocampal damage (Goodenough et al., 2004). On the other hand, kainate also induces Nrf2 dependent-ARE activation suggesting an attempt to maintain redox homeostasis (Ogita et al., 2004; Kraft et al., 2006).

Because antioxidant compounds attenuate kainate-induced death (Dutra et al., 1995; MacGregor et al., 1996; Tan et al., 1998; Rong et al., 1999) it is important to determine if a reinforcement of the Nrf2 antioxidant defense could aid in protection against excitotoxicity. In this study we have analyzed the interference between GSK-3 $\beta$  and Nrf2 in kainate-induced excitotoxicity. Our results indicate that pharmacologic intervention on both targets might ameliorate excitotoxicity-induced oxidative stress and cell death found in neurological disorders with evidence of oxidative damage to the hippocampus such as Alzheimer's disease or epilepsy.

## Results

### *Nrf2* knockout mice exhibit exacerbated ROS production and cell death in response to kainate

First, we explored the role of Nrf2 in protection against kainate-induced oxidative stress. Two hundred micron thick hippocampal slices derived from wild type or Nrf2 knockout mice were pre-incubated with the redox sensitive probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) (100  $\mu$ M for 15 min). When this probe is oxidized to fluorescein it emits green fluorescence and is widely used as a sensor for oxidative stress (Martin et al., 2001). Then, the slices were incubated with kainate (500  $\mu$ M) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM) for 2 h and finally incubated with propidium iodide (PI) (1 mg/ml, for 5 min) that accumulates in the nuclei of dead cells and emits orange fluorescence. Slices were also counterstained with Hoechst 33342 (1 mg/ml, added at the same time as PI) to visualize all nuclei (not shown). As shown in Fig. 1A, both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and kainate induced a significant increase in H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence that was more pronounced in the CA3 region and dentate gyrus. PI fluorescence increased in both kainate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated slices indicating neuronal death. H<sub>2</sub>DCFDA staining was more extended than that of PI staining, particularly for kainate-treated hippocampi, suggesting that kainate-induced-cell death is



**Fig. 1.** Nrf2 null mice exhibit exacerbated sensitivity to kainate-induced hippocampal damage. (A) 200  $\mu$ M thick hippocampal slices were pre-incubated for 15 min with the redox sensitive probe H<sub>2</sub>DCFDA (100  $\mu$ M) and then submitted to 500  $\mu$ M kainate or 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2 h. During the last 5 min slices were also submitted to PI (1 mg/ml) to detect dead cells and Hoechst 33342 (1 mg/ml) to visualize all nuclei (see Experimental methods). (B and C) Densitometric quantification of H<sub>2</sub>DCFDA and PI fluorescence in hippocampal slices from wild type and Nrf2 knockout mice. PI fluorescence values were normalized with Hoechst levels. (D) Analysis of cell death by quantification of extracellular LDH activity in slices treated under the same conditions as in A. Values are the mean of three samples. Bars indicate standard deviation. Similar results were obtained in three independent experiments.

subsequent to oxidative stress. As shown in Figs. 1B and C, quantification of fluorescence density in slices from wild type mice indicated only a subtle increase in H<sub>2</sub>DCFDA and PI fluorescence in the presence of kainate under these conditions. By contrast, slices from Nrf2 null mice exhibited 2-fold (H<sub>2</sub>DCFDA) and 4-fold (PI) fluorescence increase. As an additional means to analyze kainate-induced cell death in hippocampus, we also measured LDH activity released to the medium, which is an indication of the loss of cell membrane integrity and cell death. We found that the basal LDH activity released to the medium by hippocampal slices submitted to kainate (500  $\mu$ M) increased by 2.7- and 3.5-fold in wild type and Nrf2-deficient mice respectively (Fig. 1D). These results indicate that Nrf2 participates in prevention of both oxidative stress and cell death in response to kainate-induced excitotoxicity in the hippocampus.

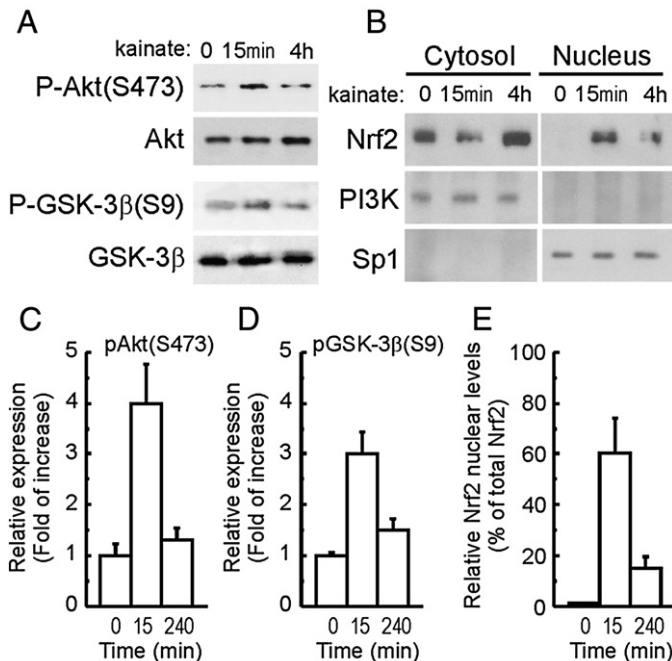
#### Time-dependent effects of kainate on regulation of Akt and GSK-3 $\beta$ kinases and on Nrf2 subcellular localization

Mice were injected intraperitoneally with 30 mg/kg kainate and hippocampal protein extracts were analyzed at different time intervals with phospho-specific antibodies which recognize active Akt, phosphorylated at S473, and inactive GSK-3 $\beta$ , phosphorylated at S9, as shown in Fig. 2A. In the untreated hippocampus, we found a basal level of Akt and GSK-3 $\beta$  phosphorylation indicating that both kinases are partially active and inactive, respectively. However, in mice injected with kainate, we found a rapid phosphorylation/activation of Akt and phosphorylation/inhibition of GSK-3 $\beta$  at 15 min, which returned back

to basal levels by 4 h treatment. Then, we analyzed the subcellular distribution of Nrf2 in response to kainate (Fig. 2B). In untreated mice, Nrf2 was mostly cytosolic in hippocampus. However, after 15 min from kainate injection, we found Nrf2 partially translocated to the nucleus. After 4 h, when Akt and GSK-3 $\beta$  were returning to basal activities, Nrf2 was relocating back to the cytosol. Therefore, these results indicate that kainate inversely influences Akt/GSK-3 $\beta$  kinases and promotes a parallel change in Nrf2 subcellular localization in mouse hippocampus.

#### GSK-3 $\beta$ inhibits the transcriptional activity of Nrf2

Previously, we have described that GSK-3 $\beta$  inhibits Nrf2 by promoting its cytosolic accumulation (Salazar et al., 2006). To determine the relevance of GSK-3 $\beta$  in the activation of endogenous Nrf2, we analyzed the regulation of the luciferase reporter ARE-LUC which contains three AREs in tandem regulating luciferase expression. We transfected N2A neuroblasts with ARE-LUC or pGL3basic as a control and with empty vector or GSK-3 $\beta$ - $\Delta$ 9 expression vector. GSK-3 $\beta$ - $\Delta$ 9 lacks the first 9 aminoterminal residues and is constitutively active (Salazar et al., 2006). After transfection, cells were submitted to SFN (3  $\mu$ M and 10  $\mu$ M) for 16 h. SFN induced a dose-dependent increase in ARE activity, as expected from its widely documented effect on Nrf2 up-regulation, but GSK-3 $\beta$ - $\Delta$ 9 expression strongly reduced this activation (Fig. 3A). Then, we tested if inhibition of GSK-3 $\beta$  with lithium (EC<sub>50</sub> 2 mM) or with the thiazolidinone TDZD8 (EC<sub>50</sub> 2  $\mu$ M) might cooperate in Nrf2 activation. N2A cells, transfected with ARE-LUC or pGL3basic vector as a control, were placed in low-serum medium (0.5% fetal calf serum) for 16 h, a condition that ensures high activity of endogenous GSK-3 $\beta$  (data not shown). Then, cells were pre-incubated without or with 10 mM lithium (from LiCl) or 30  $\mu$ M TDZD8 for 30 min and then submitted to sulforaphane (3  $\mu$ M) or tert-butylhydroquinone (tBHQ) (2  $\mu$ M) for 16 h. These concentrations were chosen to yield a partial induction that could allow us to detect cooperation with lithium. As shown in Fig. 3B, SNF and tBHQ induced at these doses a less than 2-fold induction. Lithium alone also produced a modest 2-fold induction of the ARE reporter, consistent with the release of Nrf2 from the GSK-3 $\beta$  constrain. More importantly, lithium and TDZD8 cooperated with both SFN and tBHQ in the activation of this reporter to yield about a 4-fold induction. In additional experiments, we analyzed HO-1 protein levels as an indicator of the phase II genes regulated by Nrf2. N2A neuroblasts were placed in low-serum medium, pre-incubated without or with 10 mM LiCl or 30  $\mu$ M TDZD8 for 30 min and then submitted to 3 or 10  $\mu$ M SFN for 16 h. As shown in Fig. 3C, SFN induced a dose-dependent increase in HO-1 protein levels that was maximal at 10 mM. Lithium or TDZD8 alone induced a small increase in HO-1 protein. Moreover, the combined treatment with SNF and lithium resulted in a HO-1 increase over that of SNF alone that was already maximal at 3  $\mu$ M SFN. Taken together, these results indicate that GSK-3 $\beta$  reduces the efficiency of Nrf2 inducers SFN and tBHQ and suggest that pharmacological up-regulation of the Nrf2 pathway should be more efficient in the presence of a GSK-3 $\beta$  inhibitor such as lithium.



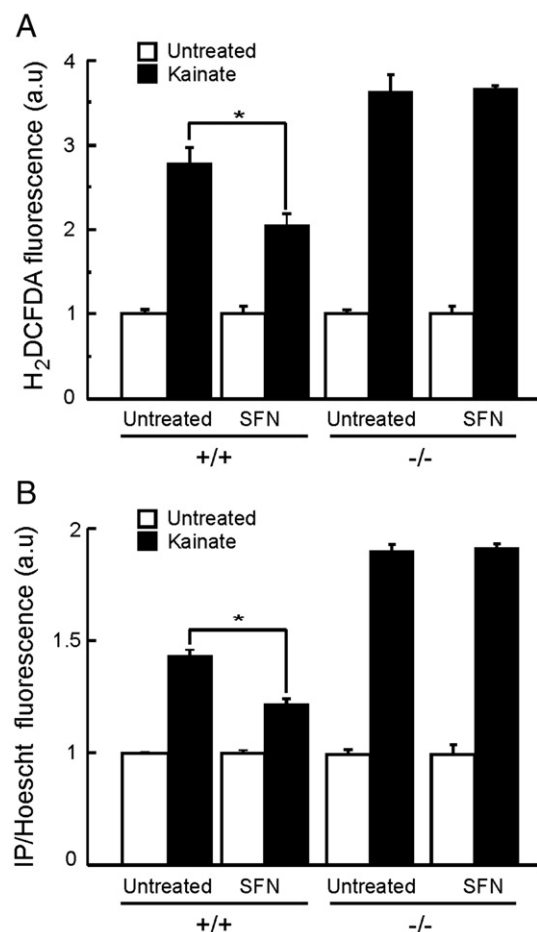
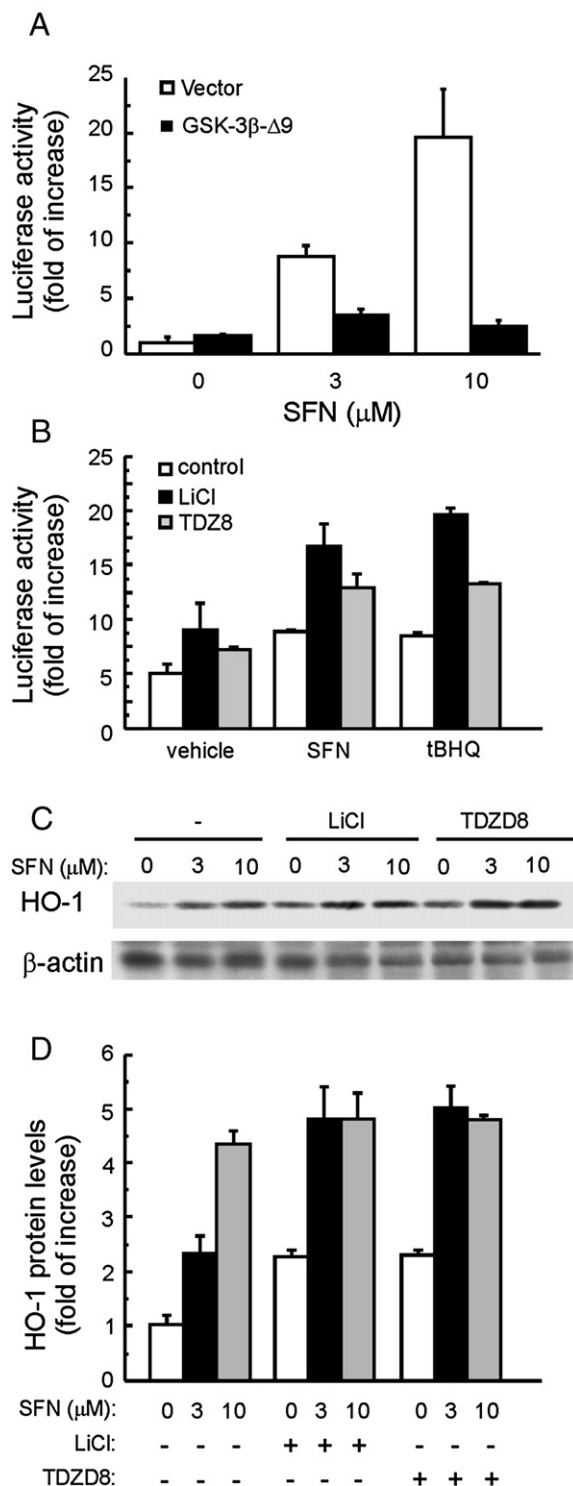
**Fig. 2.** Kainate alters Akt/GSK-3 $\beta$  phosphorylation and Nrf2 subcellular localization in hippocampus. (A) Mice were injected i.p. with 30 mg/kg kainic acid and hippocampus protein extracts were obtained at 15 min and 4 h. Upper panels, immunoblots showing active Akt phosphorylated at Ser473 (P-Akt(S473)) and total Akt (Akt). Lower panels, immunoblots showing inactive GSK-3 $\beta$  phosphorylated at Ser9 (P-GSK-3 $\beta$ (S9)) and total GSK-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). (B) Analysis of Nrf2 subcellular localization in cell fractionation assays of hippocampal protein extracts obtained from mice treated like in A. Upper panels, 50  $\mu$ g of cytosolic and nuclear protein fractions were immunoblotted with anti-Nrf2 antibodies. Middle panels, same blots immunoblotted with antibodies against p110-phosphatidylinositol 3 kinase- $\alpha$  (PI3K) as a loading control for cytosolic fractions. Lower panel, same blots immunoblotted with antibodies against the transcription factor Sp1 (Sp1) as a loading control for nuclear fractions. (C and D), densitometric quantification of P-Akt(S473) and P-GSK-3 $\beta$ (S9) levels normalized by total amounts of Akt and GSK-3 $\beta$ , respectively. (E) Densitometric estimation of the nuclear/cytosolic ratio of Nrf2 levels normalized by Sp1 (nuclear fraction) and PI3K (cytosolic fraction).

#### SFN protects against oxidative stress and cell death in hippocampi from wild type but not Nrf2-deficient mice

In view of the interference between SNF and GSK-3 $\beta$  in induction of the Nrf2 response, we designed experiments to determine if the pharmacological activation of Nrf2 by SFN and lithium might exert a protective effect against kainate-induced excitotoxicity. First, we analyzed the effect of SFN alone in wild type and Nrf2-null mice. Animals received two intraperitoneal injections of 50 mg/kg SFN (or saline) separated by 8 h. Under these conditions we have observed a significant delivery of SFN to the brain that results in increased HO-1 protein levels in wild type mice but not in Nrf2-knockout littermates (data not shown). Then, hippocampal slices were prepared as



described in Fig. 1 and treated without or with 500  $\mu$ M kainate for 2 h. As shown in Figs. 4A and B, kainate-treated animals exhibited a 3-fold increase of H<sub>2</sub>DCFDA and a 1.5-fold increase PI fluorescence, respectively, compared to saline-injected animals. Moreover, SFN reduced significantly both H<sub>2</sub>DCFDA and PI staining. By contrast, when we analyzed the protective effect of SFN on kainate-treated Nrf2-deficient mice, we found that SFN decreased ROS and cell death levels only in the wild type animals but not in knockout mice. These results indicate that Nrf2 function is necessary to promote SFN protection against kainate-induced damage.

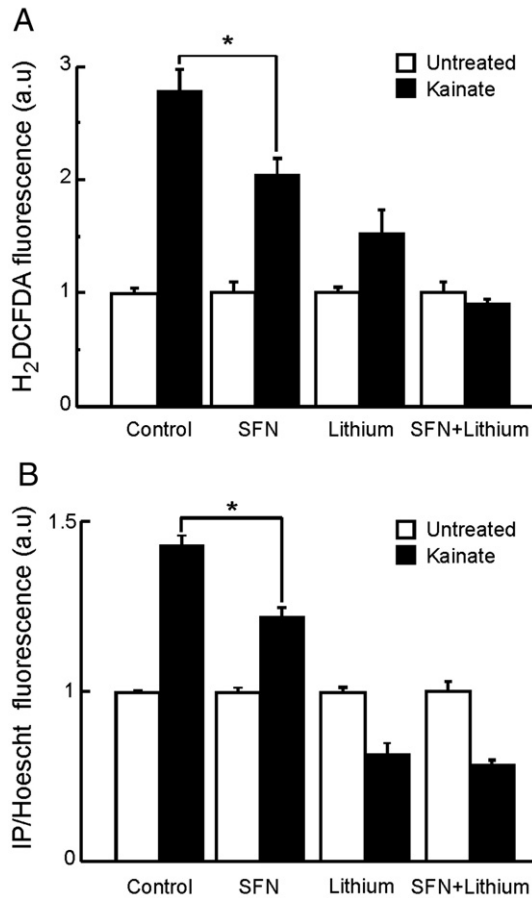


**Fig. 4.** SFN attenuates kainate-induced ROS production and cell death in hippocampus. (A) Densitometric quantification H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence in hippocampal slices. One day before dissection of hippocampi, wild type or Nrf2 knockout animals received two intraperitoneal injections of SFN (50 mg/kg) or saline separated 8 h from each other. The slices were pretreated with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA for 15 min, and challenged with 500  $\mu$ M kainate for 2 h. (B) Densitometric quantification of PI fluorescence in hippocampal slices. Slices obtained as described in A were also submitted to a last 5 min incubation with PI (1 mg/ml) and Hoechst (1 mg/ml) to detect dead cells and total cells respectively. Fluorescence density obtained with PI was normalized by the fluorescent density obtained with Hoechst. Values are the mean of three samples. Bars indicate standard deviation. Similar results were obtained in three independent experiments.

#### SFN and lithium mitigate hippocampal damage induced by kainate

Then we analyzed the effect of a combined treatment with SFN and lithium. Hippocampal slices from mice that had received two intraperitoneal injections of 50 mg/kg SFN (or saline) separated by 8 h were pretreated with the fluorescence probe H<sub>2</sub>DCFDA for 15 min and with 10 mM LiCl for 1 h, then with 500  $\mu$ M kainate for 2 h, and

**Fig. 3.** Modulation of Nrf2 transcriptional activity by GSK-3 $\beta$ . (A) SFN induction of AREs is attenuated by GSK-3 $\beta$ - $\Delta$ 9 expression. N2A neuroblasts were transfected with ARE-LUC or pGL3basic control vector and either empty vector or GSK-3 $\beta$ - $\Delta$ 9 expression vector. After transfection cells were treated with the indicated SFN concentrations for 16 h and then analyzed for luciferase activity. (B) Lithium and TDZD8 enhance the activation of ARE-LUC by SFN and tBHQ. N2A neuroblasts were transfected with ARE-LUC or pGL3basic as control vector, pre-incubated for 30 min with 10 mM LiCl or 30  $\mu$ M TDZD8 and then supplemented with 3  $\mu$ M SFN or 2  $\mu$ M tBHQ for 16 h. (C) Lithium and TDZD8 cooperate with SFN to elevate HO-1 protein levels. N2A neuroblasts were placed in low-serum medium and pretreated with or without 10 mM LiCl or 30  $\mu$ M TDZD8 and incubated with 3  $\mu$ M sulforaphane during 16 h. Upper panel, immunoblot showing HO-1 protein levels. Lower panel, immunoblot showing similar amount of  $\beta$ -actin levels per lane. For A and C luciferase activity is represented relative to the values of the same experiment conducted on the promoterless pGL3basic luciferase control plasmid. Values are the mean of three samples. Bars indicate standard deviation. Similar results were obtained in three independent experiments.



**Fig. 5.** SFN combined with lithium ameliorated kainate-induced ROS production and cell death in hippocampus. (A) Densitometric quantification H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence in hippocampal slices. One day before dissection of hippocampi animals received two intraperitoneal injections of SFN (50 mg/kg) or saline separated 8 h from each other. The slices were pretreated with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA for 15 min, pre-incubated or not with 10 mM LiCl during 1 h and challenged with 500  $\mu$ M kainate for 2 h. (B) Densitometric quantification of PI fluorescence in hippocampal slices. Slices obtained as described in A were also submitted to a last 5 min incubation with PI (1 mg/ml) and Hoescht (1 mg/ml) to detect dead cells and total cells respectively. Fluorescent density obtained with PI was normalized by the fluorescent density obtained with Hoescht. Values are the mean of three samples. Bars indicate standard deviation. Similar results were obtained in three independent experiments.

PI/Hoescht for 5 min. As shown in Fig. 5A, kainate induced about a 3-fold increase of H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence that was partially prevented by SFN. But more importantly, lithium also diminished the ROS levels and the combination of SFN with lithium was the most effective in ROS reduction yielding a H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence similar to that of kainate-untreated slices. Regarding cell death, as shown in Fig. 5B, SFN produced a significant reduction in PI staining. Lithium alone promoted a drastic reduction of kainate-induced cell death to basal levels (see Discussion) and the combination of SFN and lithium was more efficient than any of the compounds alone reducing cell death even below basal levels caused by slice manipulation. Taken together, these results indicate that SFN and lithium cooperate in protection of hippocampus against kainate-induced oxidative stress and cell death.

## Discussion

In this study, we analyzed the regulation of Nrf2 by GSK-3 $\beta$  in the context of kainate-induced oxidative stress. Using Nrf2-null mice, we found that Nrf2 organizes an antioxidant response to kainate-induced excitotoxicity because these mice exhibited higher levels of hippocampal ROS production and cell death than the control wild type

littermates. In agreement with these results, Johnson's group has described that kainate induced more prolonged and fatal seizures in Nrf2 null than in wild type mice, accompanied with elevated hippocampal astrogliosis and microgliosis (Kraft et al., 2006).

It is however a fact that numerous neurons succumb to the excitotoxic insult despite having a functional Nrf2 response. This raises the question to whether Nrf2 could be pharmacologically up-regulated to maximal capacity by compounds such as SFN to provide a stronger protection (Mattson and Cheng 2006). An obstacle to achieve this goal is the existence of naturally occurring negative regulatory loops that reduce the therapeutic benefit of these compounds. A critical protein kinase involved in such negative feedback mechanism is GSK-3 $\beta$ . In this study, we found that following kainate treatment there was a short-term inhibition of GSK-3 $\beta$  which correlated with Nrf2 nuclear localization and we interpret this as an attempt to maintain redox homeostasis. However, a more prolonged kainate treatment led to GSK-3 $\beta$  dephosphorylation/activation and a reduced amount of Nrf2 nuclear levels. These observations suggest that long-term oxidative stress leads to GSK-3 $\beta$  activation and to the down-regulation of Nrf2 antioxidant regulated genes, therefore limiting the antioxidant cell capacity. Accordingly, in a previous study we showed that GSK-3 $\beta$  over-expression sensitized neuroblasts to oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rojo et al., 2007) and Pallas' group described that long-term kainate treatment conduces to ERK and Akt deregulation, GSK-3 $\beta$  activation and elevated caspase-3 levels (Crespo-Biel et al., 2007).

Different studies have shown that GSK-3 $\beta$  is an important molecular component of hippocampal neuron fate and that its inhibition with lithium is neuroprotective (Phiel et al., 2003; Goodenough et al., 2004; Su et al., 2004; Nakashima et al., 2005; Noble et al., 2005; Yoshida et al., 2006). For instance, Busceti et al. described higher levels of Dkk-1, an endogenous Wnt signaling inhibitor (therefore an activator of GSK-3 $\beta$ ), associated with seizures caused by kainate treatment (Busceti et al., 2007). Finally, indirect proof that GSK-3 $\beta$  is hyperactivated under excitotoxic conditions is provided by biopsies from patients with medically refractory epilepsy where dysplastic neurons exhibit increased GSK-3 $\beta$  expression (Cotter et al., 1999) and augmented levels of tau phosphorylated by GSK-3 $\beta$  (Sen et al., 2007).

The *in vivo* activation of the Nrf2/HO-1 pathway in the brain may be an important strategy to mitigate the effects of oxidative stress in neurodegenerative diseases. The use of protoporphyrins, Coprotoporphyrins IX and Sn-protoporphyrins IX, have proven to be excellent tools to respectively activate or inhibit HO-1 in peripheral tissues with a reasonably low level of toxicity. However, this approach has remained elusive for its use in brain because these compounds do not pass the blood brain barrier efficiently (unpublished observations and Marinissen et al., 2006). Other strategy might be the pharmacological activation of Nrf2, which in addition to activating HO-1 expression might provide additional protection by up-regulating other phase II genes. To this end, we used SFN, a compound found in cruciferous vegetables, which disrupts the Nrf2/Keap1 interaction leading to Nrf2 stabilization and nuclear localization and to expression of ARE-containing phase II genes (Juge et al., 2007). In hippocampal slices we found that SFN prevents oxidative stress and cell death induced by kainate. SFN protection is at least in part mediated by Nrf2, because it did not occur in Nrf2-deficient mice. Sulforaphane activates this system through specific modifications of the Keap1 protein, forming thionoacyl adducts on Keap1 (Juge et al., 2007). It is not clear if other electrophilic compounds or alkylating agents may have a similar role under physiological conditions. One attractive candidate is 15-deoxy-Delta (12,14)-prostaglandin J(2) (15d-PGJ(2)) (Kim and Surh, 2006). In this molecule the cyclopentenone ring can act as a Michael reaction acceptor and readily interact with cysteine thiol groups in Keap1. Further investigation is required to identify additional

molecules that participate in the physiological disruption of the Nrf2/Keap1 complex.

GSK-3 $\beta$  inhibition led to elevated Nrf2 transcriptional activity. Therefore, in the same experimental conditions we analyzed if lithium could cooperate with SFN in induction of the Nrf2 response and in protection against kainate-induced oxidative stress and cell death. Hippocampi from mice submitted to lithium or SFN exhibited lower levels of ROS generation and PI incorporation than control animals. Surprisingly, lithium alone produced a drastic reduction of these parameters. While lithium must be inhibiting GSK-3 $\beta$  leading to up-regulation of the Nrf2 response, it seems unlikely that this is the only mechanism used in oxidant and cell death protection because in the hippocampal slice setting, the incubation time used (3 h as a whole) was probably too short to elicit a robust phase II two response. In an attempt to circumvent this problem, we kept mice under a lithium rich diet (up to 4 g lithium per kg chow) but plasma levels of lithium did not exceed 1 mM (data not shown) which seems too far below the levels required for efficient GSK-3 $\beta$  inhibition (EC<sub>50</sub> 2 mM). We are now testing other potent and specific GSK-3 $\beta$  inhibitors that might be delivered more efficiently into the brain.

Those compounds have yet to be found and characterized. In the meantime the present study provides the proof of concept that combined pharmacologic strategies aimed at increasing the Nrf2 response and at inhibiting the GSK-3 $\beta$ -dependent feedback may provide efficient neuroprotection against excitotoxic damage.

## Experimental methods

### Cell culture and reagents

Mouse Neuro 2A (N2A) neuroblasts were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 80 mg/ml gentamycin. Kainic acid, ter-butylhydroquinone and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Lithium chloride was from MERCK (Madrid, Spain). Sulforaphane was provided by LKT Laboratories (Minnesota, USA). TDZD8 was supplied by Calbiochem (San Diego, USA).

### Animals

Eight-week-old Nrf2 knockout mice and wild type littermates were housed at 22 °C under a 12 h light–dark cycle. Food and water was provided *ad libitum*. Animals were cared for according to a protocol approved by the Ethical Committee for Research of the Universidad Autónoma de Madrid following institutional, Spanish and European guidelines (Boletín Oficial del Estado (BOE) of 18 March 1988; and 86/609/EEC, 2003/65/EC European Council Directives).

### Plasmids

Expression vector pCGN-GSK-3 $\beta$ - $\Delta$ 9 was provided by Dr. Akira Kikuchi (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hiroshima University, Japan). For luciferase assays, transient transfections of N2A cells were performed with the expression vectors pGL3basic, ARE-LUC (Dr. J. Alam, Department of Molecular Genetics, Ochsner Clinics Foundation, New Orleans, LA).

### Luciferase assays

N2A cells were seeded in 24-well plates (75,000 cells per well), cultured for 16 h and transfected with TransFast reagent (Promega, Madison, WI). 100 ng of ARE-LUC or pGL3basic vector and 900 ng of empty vector or pCGN-GSK-3 $\beta$ - $\Delta$ 9 were incubated with 3  $\mu$ l of Trans-fast reagent in 400  $\mu$ l of DMEM medium during 15 min and added to the cells. After 1 h the medium was supplemented with 400  $\mu$ l of DMEM with 20% fetal bovine serum and 160 mg/ml gentamycin.

About 70% of the cells were efficiently transfected as we determined in previous FACs assays using EGFP expression. After 24 h from transfection, cells were lysed and assayed for luciferase activity with the Luciferase Assay System (Promega). Relative light units were measured in a BG1 Optocomp I, GEM Biomedical luminometer (Sparks, NV).

### Immunoblotting

The primary antibodies were: anti-Nrf2 (C-20) and anti-Sp1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anti-phospho-Akt (Ser473) (New England Biolabs, Beverly, MA); anti-HO-1 (Chemicon, Temecula, CA); anti-p110 phosphatidylinositol 3 kinase- $\alpha$  (PI3K) and anti-phospho-GSK-3 $\beta$  (Ser9) (Cell Signaling Technology Inc., Lake Placid, NY). Cells were washed once with cold PBS and lysed on ice with lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1% Nonidet P-40, 10% glycerol, and 1  $\mu$ g/ml leupeptin). Pre-cleared cell lysates were resolved in SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Billerica, MA). These membranes were analyzed by using the primary antibodies indicated above and appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

### Preparation of nuclear and cytosolic extracts

Cytosolic and nuclear fractions were prepared as previously described (Rojo et al., 2004). Briefly, the hippocampal tissue was homogenized in three pellet volumes of cold buffer A (20 mM HEPES pH 7.0, 0.15 mM EDTA, 0.015 mM EGTA, 10 mM KCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1% Nonidet P-40, and 1  $\mu$ g/ml leupeptin). Then, the homogenate was centrifuged at 500 g for 5 min. The supernatant corresponding to the cytosolic fraction was resolved in SDS-PAGE and blotted. The nuclear pellet was re-suspended in five pellet volumes of cold buffer B (10 mM HEPES pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 25% glycerol, 0.1 M NaCl, and 1  $\mu$ g/ml leupeptin). After centrifugation in the same conditions indicated above, the nuclei were re-suspended in two pellet volumes of hypertonic cold buffer C (10 mM HEPES pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 25% glycerol, 0.4 M NaCl, and 1  $\mu$ g/ml leupeptin) and were incubated for 30 min at 4 °C in a rotating wheel. Nuclear debris was removed by centrifugation at 900 g for 20 min at 4 °C. The supernatant, corresponding to the nuclear fraction, was resolved in SDS-PAGE and blotted. Blots were probed with anti-Nrf2 (C20), anti-PI3K and anti-Sp1 antibodies.

### Hippocampal slices and measurement of cell death

Mice were decapitated, and each brain was rapidly placed in ice-cold Krebs-bicarbonate dissection buffer pH 7.4 (120 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 mM glucose and 200 mM sucrose). All chamber solutions were pre-bubbled with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> gas mixture, for at least 45 min before slice immersion, to ensure O<sub>2</sub> saturation. Hippocampi were quickly dissected, glued down leaning vertically against agar blocks in a small chamber, submerged in cold oxygenated dissection buffer and sectioned in 200  $\mu$ m thick transverse slices using a vibratome (TS1000 Leica; Heidelberg, Germany). Cutting parameters were 0.5 mm/s, 60 Hz and 0.8 mm amplitude. Immediately after vibratome sectioning, the slices (the two first most anterior slices were discarded) were transferred to a vial of sucrose-free dissection buffer, and bubbled with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> at room temperature for 60 min to



recover from slicing trauma. After this period, slices were loaded with 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>DCFDA (Invitrogen) for 45 min in Krebs solution (120 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.19 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 11 mM glucose). Subsequently, slices were washed twice with Krebs solution and kept for 15 min before the beginning of the experiment. Then, slices were exposed to 500  $\mu\text{M}$  kainic acid for 2 h, 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h or Krebs solution. Finally, in the last 5 min of incubation slices were loaded with 1 mg/ml propidium iodide (PI) and with 1 mg/ml Hoechst 33342. Fluorescence measurements were done with an inverted fluorescence microscope (Nikon eclipse TE300). H<sub>2</sub>DCFDA was excited at 485 nm; emitted light was transmitted through a 505 nm dichroic mirror and 520 nm emission filter; PI was excited at 530 nm; emitted light was transmitted through a 575 nm dichroic mirror and 580 nm emission filter; Hoechst was excited at 340 nm; emitted light was transmitted through a 400 nm dichroic mirror and 460 nm emission filter. The viability of hippocampal slices, after a given treatment, was also monitored by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH) released into the incubation media. LDH activity was spectrophotometrically measured at 490–620 nm in a microplate reader (Labsystems iEMS reader MF) using a Cytotoxicity Cell Death kit (Roche, Madrid, Spain), according to the manufacturer's instructions.

### Image analysis, quantification and statistics

Densitometric analysis of H<sub>2</sub>DCFDA and PI/Hoescht33342 stained slices was done with Metafluor Analyst software (MDS Analytical Technologies Downingtown, PA). Student's *t* test was used to assess differences between groups. A *p* value < 0.05 was considered significant. Unless indicated, all experiments were performed at least three times with similar results. The values in the graphs correspond to the mean of at least three samples. Error bars indicate standard deviation.

### Acknowledgments

This work was supported by grant SAF2007-62646 from Spanish Ministry of Education (MEC) and grant 2005 for Fundación Médica Mutua Madrileña.

### References

- Ben-Ari, Y., 1981. Epilepsy: changes in local glucose consumption and brain pathology produced by kainic acid. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 27, 385–394.
- Bijur, G.N., De Sarno, P., Jope, R.S., 2000. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J. Biol. Chem.* 275, 7583–7590.
- Bournat, J.C., Brown, A.M., Soler, A.P., 2000. Wnt-1 dependent activation of the survival factor NF- $\kappa$ B in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 61, 21–32.
- Busceti, C.L., Biagioni, F., Aronica, E., Rizzo, B., Storto, M., Battaglia, G., Giorgi, F.S., Gradini, R., Fornai, F., Caricasole, A., Nicoletti, F., Bruno, V., 2007. Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48, 694–705.
- Carrasco, J., Penkowa, M., Hadberg, H., Molinero, A., Hidalgo, J., 2000. Enhanced seizures and hippocampal neurodegeneration following kainic acid-induced seizures in metallothionein-I+II-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2311–2322.
- Cotter, D., Honavar, M., Lovestone, S., Raymond, L., Kerwin, R., Anderton, B., Everall, I., 1999. Disturbance of Notch-1 and Wnt signalling proteins in neuroglial balloon cells and abnormal large neurons in focal cortical dysplasia in human cortex. *Acta Neuropathol.* 98, 465–472.
- Crespo-Biel, N., Canudas, A.M., Camins, A., Pallas, M., 2007. Kainate induces AKT, ERK and cdk5/GSK3 $\beta$  pathway deregulation, phosphorylates tau protein in mouse hippocampus. *Neurochem. Int.* 50, 435–442.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–789.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P., 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11908–11913.
- Dutrait, N., Culcasi, M., Cazevielle, C., Pietri, S., Tordo, P., Bonne, C., Muller, A., 1995. Calcium-dependent free radical generation in cultured retinal neurons injured by kainate. *Neurosci. Lett.* 198, 13–16.
- Dykens, J.A., Stern, A., Trenkner, E., 1987. Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. *J. Neurochem.* 49, 1222–1228.
- Emerson, M.R., Samson, F.E., Pazdernik, T.L., 2000. Effects of hypoxia preconditioning on expression of metallothionein-1.2 and heme oxygenase-1 before and after kainic acid-induced seizures. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 46, 619–626.
- Ferkany, J.W., Zaczek, R., Coyle, J.T., 1982. Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature* 298, 757–759.
- Fujikawa, D.G., 2000. Confusion between neuronal apoptosis and activation of programmed cell death mechanisms in acute necrotic insults. *Trends Neurosci.* 23, 410–411.
- Garthwaite, G., Garthwaite, J., 1986. Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slices: dependence on calcium concentration. *Neurosci. Lett.* 66, 193–198.
- Goodenough, S., Conrad, S., Skutella, T., Behl, C., 2004. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  protects against kainic acid-induced neurotoxicity in vivo. *Brain Res.* 1026, 116–125.
- Grimes, C.A., Jope, R.S., 2001. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3  $\beta$  and facilitated by lithium. *J. Neurochem.* 78, 1219–1232.
- Huang, E., Ong, W.Y., Go, M.L., Garey, L.J., 2005. Heme oxygenase-1 activity after excitotoxic injury: immunohistochemical localization of bilirubin in neurons and astrocytes and deleterious effects of heme oxygenase inhibition on neuronal survival after kainate treatment. *J. Neurosci. Res.* 80, 268–278.
- Juge, N., Mithen, R.F., Traka, M., 2007. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 1105–1127.
- Katsuoka, F., Motohashi, H., Ishii, T., Aburatani, H., Engel, J.D., Yamamoto, M., 2005. Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes. *Mol. Cell Biol.* 25, 8044–8051.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S., 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1–Nrf2–ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89–116.
- Kim, E.H., Surh, Y.J., 2006. 15-deoxy-Delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1516–1528.
- Kim, D.W., Lee, J.H., Park, S.K., Yang, W.M., Jeon, G.S., Lee, Y.H., Chung, C.K., Cho, S.S., 2007. Astrocytic expressions of phosphorylated Akt, GSK3 $\beta$  and CREB following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus. *Neurochem. Res.* 32, 1460–1468.
- Kraft, A.D., Lee, J.M., Johnson, D.A., Kan, Y.W., Johnson, J.A., 2006. Neuronal sensitivity to kainic acid is dependent on the Nrf2-mediated actions of the antioxidant response element. *J. Neurochem.* 98, 1852–1865.
- Lee, O.H., Jain, A.K., Papusha, V., Jaiswal, A.K., 2007. An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J. Biol. Chem.* 282, 36412–36420.
- Liu, W., Liu, R., Chun, J.T., Bi, R., Hoe, W., Schreiber, S.S., Baudry, M., 2001. Kainate excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures: evidence for multiple apoptotic pathways. *Brain Res.* 916, 239–248.
- Lo, S.C., Li, X., Henzl, M.T., Beamer, L.J., Hannink, M., 2006. Structure of the Keap1: Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *Embo. J.* 25, 3605–3617.
- MacGregor, D.G., Jones, P.A., Maxwell, W.L., Graham, D.I., Stone, T.W., 1996. Prevention by a purine analogue of kainate-induced neuropathology in rat hippocampus. *Brain Res.* 725, 115–120.
- Marinissen, M.J., Tanos, T., Bolos, M., de Sagarra, M.R., Coso, O.A., Cuadrado, A., 2006. Inhibition of heme oxygenase-1 interferes with the transforming activity of the Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 11332–11346.
- Martin, D., Salinas, M., Lopez-Valdaliso, R., Serrano, E., Recuero, M., Cuadrado, A., 2001. Effect of the Alzheimer amyloid fragment A $\beta$ (25–35) on Akt/PKB kinase and survival of PC12 cells. *J. Neurochem.* 78, 1000–1008.
- Mattson, M.P., Cheng, A., 2006. Neurohormetic phytochemicals: low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends Neurosci.* 29, 632–639.
- Nakashima, H., Ishihara, T., Sugimoto, P., Yokota, O., Oshima, E., Kugo, A., Terada, S., Hamamura, T., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Kuroda, S., 2005. Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathol.* 110, 547–556.
- Nicholls, D.G., Budd, S.L., 1998. Neuronal excitotoxicity: the role of mitochondria. *Biofactors* 8, 287–299.
- Noble, W., Planell, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L., LaFrancis, J., Feinstein, B., Burns, M., Krishnamurthy, P., Wen, Y., Bhat, R., Lewis, J., Dickson, D., Duff, K., 2005. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6990–6995.
- Ogita, K., Kubo, M., Nishiyama, N., Watanabe, M., Nagashima, R., Yoneda, Y., 2004. Enhanced binding activity of nuclear antioxidant-response element through possible formation of Nrf2/Fos-B complex after in vivo treatment with kainate in murine hippocampus. *Neuropharmacology* 46, 580–589.
- Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M., Klein, P.S., 2003. GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptides. *Nature* 423, 435–439.
- Puttfarcken, P.S., Getz, R.L., Coyle, J.T., 1993. Kainic acid-induced lipid peroxidation: protection with butylated hydroxytoluene and U7517F in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res.* 624, 223–232.

- Rojo, A.I., Salinas, M., Martin, D., Perona, R., Cuadrado, A., 2004. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J. Neurosci.* 24, 7324–7334.
- Rojo A.I., Sagarra M.R., Cuadrado A., 2007. GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J. Neurochem.*
- Rong, Y., Doctrow, S.R., Tocco, G., Baudry, M., 1999. EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neuropathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9897–9902.
- Salazar, M., Rojo, A.I., Velasco, D., de Sagarra, R.M., Cuadrado, A., 2006. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* 281, 14841–14851.
- Schulz, J.B., Henshaw, D.R., Siwek, D., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Cipolloni, P.B., Kowall, N.W., Rosen, B.R., Beal, M.F., 1995. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J. Neurochem.* 64, 2239–2247.
- Sen, A., Thom, M., Martinian, L., Harding, B., Cross, J.H., Nikolic, M., Sisodiya, S.M., 2007. Pathological tau tangles localize to focal cortical dysplasia in older patients. *Epilepsia* 48, 1447–1454.
- Stringer, J.L., Gaikwad, A., Gonzales, B.N., Long Jr., D.J., Marks, L.M., Jaiswal, A.K., 2004. Presence and induction of the enzyme NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 in the central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 471, 289–297.
- Su, Y., Ryder, J., Li, B., Wu, X., Fox, N., Solenberg, P., Brune, K., Paul, S., Zhou, Y., Liu, F., Ni, B., 2004. Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry* 43, 6899–6908.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W., Kim, S.J., El-Sokkary, G.H., 1998. Melatonin protects hippocampal neurons in vivo against kainic acid-induced damage in mice. *J. Neurosci. Res.* 54, 382–389.
- Tong, K.I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., Yamamoto, M., 2006. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2887–2900.
- Walton, M.R., Dragunow, I., 2000. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci.* 23, 48–53.
- Woodgett, J.R., 1994. Regulation and functions of the glycogen synthase kinase-3 subfamily. *Semin. Cancer Biol.* 5, 269–275.
- Yoshida, S., Maeda, M., Kaku, S., Ikeya, H., Yamada, K., Nakaike, S., 2006. Lithium inhibits stress-induced changes in tau phosphorylation in the mouse hippocampus. *J. Neural Transm.* 113, 1803–1814.



## SCF/ $\beta$ -TrCP Promotes Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Degradation of the Nrf2 Transcription Factor in a Keap1-Independent Manner<sup>∇</sup>

Patricia Rada,<sup>1,2,†</sup> Ana I. Rojo,<sup>1,2,†</sup> Sudhir Chowdhry,<sup>3</sup> Michael McMahon,<sup>3</sup>  
John D. Hayes,<sup>3</sup> and Antonio Cuadrado<sup>1,2,\*</sup>

*Centro de Investigación Biomédica en red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain<sup>1</sup>; Dpto. de Bioquímica and Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols UAM-CSIC, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain<sup>2</sup>; and Biomedical Research Institute, Ninewells Hospital and Medical School, University of Dundee, Dundee DD1 9SY, Scotland, United Kingdom<sup>3</sup>*

Received 13 October 2010/Returned for modification 12 November 2010/Accepted 3 January 2011

**Regulation of transcription factor Nrf2 (NF-E2-related factor 2) involves redox-sensitive proteasomal degradation via the E3 ubiquitin ligase Keap1/Cul3. However, Nrf2 is controlled by other mechanisms that have not yet been elucidated. We now show that glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) phosphorylates a group of Ser residues in the Neh6 domain of mouse Nrf2 that overlap with an SCF/ $\beta$ -TrCP destruction motif (DSGIS, residues 334 to 338) and promotes its degradation in a Keap1-independent manner. Nrf2 was stabilized by GSK-3 inhibitors in Keap1-null mouse embryo fibroblasts. Similarly, an Nrf2<sup>ΔETGE</sup> mutant, which cannot be degraded via Keap1, accumulated when GSK-3 activity was blocked. Phosphorylation of a Ser cluster in the Neh6 domain of Nrf2 stimulated its degradation because a mutant Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup> protein, lacking these Ser residues, exhibited a longer half-life than Nrf2<sup>ΔETGE</sup>. Moreover, Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup> was insensitive to  $\beta$ -TrCP regulation and exhibited lower levels of ubiquitination than Nrf2<sup>ΔETGE</sup>. GSK-3 $\beta$  enhanced ubiquitination of Nrf2<sup>ΔETGE</sup> but not that of Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>. The Nrf2<sup>ΔETGE</sup> protein but not Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup> coimmunoprecipitated with  $\beta$ -TrCP, and this association was enhanced by GSK-3 $\beta$ . Our results show for the first time that Nrf2 is targeted by GSK-3 for SCF/ $\beta$ -TrCP-dependent degradation. We propose a “dual degradation” model to describe the regulation of Nrf2 under different pathophysiological conditions.**

A disadvantage of aerobic life is the constant generation of potentially damaging reactive oxygen species (ROS). The intracellular levels of such species need to be tightly controlled in order to avoid oxidative stress. Transcription factor Nrf2 (NF-E2-related factor 2) plays a critical role in redox homeostasis since it increases the expression of many antioxidant and drug-metabolizing genes, including those encoding heme oxygenase 1 (HO-1), NADPH:quinone oxidoreductase 1, glutathione *S*-transferases, glutamate-cysteine ligase, and glutathione peroxidases, in response to oxidative and electrophile stressors (13). These genes all contain a common promoter enhancer called the antioxidant response element (ARE) and are transactivated by Nrf2. Because ROS play a role as intracellular signaling molecules for many physiological processes, Nrf2 can have an impact on numerous cell functions, ranging from differentiation and development to proliferation and inflammation. Therefore, Nrf2 activity influences neurodegenerative disease, cardiovascular disease, and cancer (3, 4, 14, 16, 17, 49, 53).

While increased Nrf2 transcriptional activity enhances cellular antioxidant defenses and increases the capacity to detoxify drugs, it may also lead to unwanted side effects. For instance, in tumors, high levels of Nrf2 activity have been

correlated with a poor prognosis (41). Indeed, high Nrf2 activity has not been favored during evolution (25), but its levels are restricted via both redox-dependent and redox-independent pathways in normal healthy cells (29).

In normal cells, Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), an E3 ubiquitin ligase substrate adaptor, regulates the level of Nrf2 protein in a redox-dependent fashion (5, 20, 51). The interaction between Nrf2 and Keap1 occurs via a “two-site tethering” process, otherwise called the “hinge and latch” mechanism. In this model, two motifs, a high-affinity ETGE motif and a low-affinity DLG motif, within the N-terminal Neh2 domain of Nrf2 each interact with a separate Kelch repeat domain present in the Keap1 homodimer (40). Both the ETGE motif and the DLG motif are required for the transcription factor to be repressed by Keap1 (28). In addition to its interaction with Nrf2, Keap1 also binds Cullin 3 (Cul3), which forms a core E3 ubiquitin ligase complex through an association with Ring-box1 protein (Rbx1, also called Roc1) (5, 10, 20, 51). The Keap1-Cul3-Rbx1 complex is able to ubiquitinate Nrf2 and target it for proteasomal degradation only under normal redox conditions, and upon exposure to oxidants or electrophiles, Cys-151, Cys-273, and Cys-288 in Keap1 become modified, leading to disturbance of the interaction between Nrf2 and Keap1 (8, 21, 49, 50). Failure of Nrf2 to dock simultaneously onto both Kelch repeat domains enables it to escape ubiquitination by Cul3-Rbx1 (21, 32, 47, 50). Thus, stress-related modification of Keap1 results in Nrf2 stabilization, accumulation of the transcription factor in the nucleus, and upregulation of ARE-driven genes. Perturbation of the

\* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols UAM-CSIC, C/Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Phone: 34915854383. Fax: 34915854401. E-mail: antonio.cuadrado@uam.es.

† Patricia Rada and Ana I. Rojo should be considered first authors.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 18 January 2011.

Nrf2-Keap1 complex by oxidants and electrophiles is considered the principal mechanism by which Nrf2 accumulates and induces the ARE-gene battery. However, other regulatory mechanisms must exist in order to explain the following: (i) how Nrf2 contributes to the basal expression of certain ARE-driven genes under normal homeostatic conditions, (ii) how Nrf2 activity returns to its low basal levels after the intracellular redox balance has been restored, and (iii) how Nrf2 activity is limited during oxidative and electrophile stress.

Conventional cell signaling studies have suggested that Nrf2 might be regulated by protein phosphorylation (2, 6, 15, 18, 36, 44). Previously, we presented data suggesting that GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) influences the nuclear exclusion and inactivation of Nrf2 (37–39). However, the mechanistic connection between GSK-3 and Nrf2 remains largely unexplored. A number of studies have demonstrated that GSK-3 directs the ubiquitination and proteasomal degradation of various transcription factors and other proteins by SCF/ $\beta$ -TrCP; these include Snail (54),  $\beta$ -catenin (1, 22, 34), Gli2 and Gli3 (33, 48), Xom (55), Cdc 25a (19), FGD1 and -3 (11, 12), Mcl-1 (7), securin (24), prolactin receptor (46), and the phosphatase PHLPP1 (23). In these instances, GSK-3 phosphorylates a cluster of Ser/Thr residues in target proteins, which are then recognized by SCF/ $\beta$ -TrCP. In turn, the complex formed by SCF/ $\beta$ -TrCP binds the Cullin-1 (Cul1) scaffold protein to form a complete E3 ligase by association with a linker protein called Skp1 and with Rbx1. Therefore,  $\beta$ -TrCP is an adapter protein that contains a Skp1-binding site called F-box and a WD recognition domain for phosphorylated substrates in the consensus motif DpSGX<sub>(1–4)</sub>pS (9, 42).

To date, the existence of a phosphodegron in Nrf2 has not been explored. In the present article, we report that Nrf2 is destabilized as a consequence of its phosphorylation by GSK-3 and subsequent ubiquitination by SCF/ $\beta$ -TrCP. This pathway represents an alternative mechanism to the Keap1-dependent degradation of Nrf2 and provides a means by which this transcription factor can be regulated in a redox-independent manner.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture and reagents.** Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 80 mg/ml gentamicin. Mouse embryo fibroblasts (MEFs) from Keap1 knockout mice and wild-type littermates (kindly provided by Ken Itoh, Center for Advanced Medical Research, Hiroaki University Graduate School of Medicine, Japan) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.5 U/ml penicillin, and 0.5  $\mu$ g/ml streptomycin. Transient transfection of HEK293T cells was performed with calcium phosphate, using reagents from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). SB216763 and MG132 were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Cycloheximide (CHX) was purchased from Boehringer Mannheim (Germany).

**Plasmids.** The expression vectors pcDNA3.1/V5HisB-mNrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>, pcDNA3.1/V5-mNrf2 <sup>$\Delta$ ETGE $\Delta$ Nch6</sup>, pHis-Ub, and pET-mNrf2 have been described previously (29). The vectors pCGN-HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup> and pCGN-HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 216F</sup> were provided by Akira Kikuchi (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hiroshima University), and GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9A</sup> (pcDNA3-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9A</sup>-HA) was a kind gift of Richard Jope (Department of Psychiatry, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL). A plasmid encoding  $\beta$ -TrCP2 <sup>$\Delta$ Fbox</sup> (pcDNA3 $\beta$ -TrCP2 <sup>$\Delta$ Fbox</sup>-HA) was provided by Serge Y. Fuchs (Department of Animal Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA). pcDNA3-Flag- $\beta$ -TrCP2 was provided by Tomoki Chiba (Department of Molecular Biology, University of Tsukuba, Japan). The expression construct pcDNA3.1/V5HisB-mNrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A</sup>, with point mutations S335A, S338A, S342A, S347A, S351A, and S355A, was created using the GeneTailor site-directed mutagenesis system (Invitrogen) and the following primers: 5' TGGAA

ATTCAATGACTCTGACGCTGGCATTGCACTGAAGACGGCTCCCAGCCGAGCGCCCCAGA 3' and 5' GTACAGATCATTGAATTCCATTGTGCCTTCAGCGTGCTTC 3' (mutation sites are underlined) using pcDNA3.1/V5 HisB-mNrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 3S/3A</sup> (point mutations at S347A, S351A, and S355A) as a template in two sequential PCR amplifications with the following primers: forward (PCR1), 5'-GAGCGGCCCCAGAGCATGCCGTGGAGTCTGCCATTACGG-3', and reverse (PCR1), 5'-CGATCTCGAGGCCACTGTGCTGGAT-3'; forward (PCR2), 5'-CGATCATATGATGGACTTGGAGTTG-3', and reverse (PCR2), 5'-CCGTAAATGGCAGACTCCACGGCATGCTCTGGGGCCGCTC-3'. The NdeI/XhoI fragment from pcDNA3.1/V5 HisB-mNrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A</sup> was cloned into pET-15b to generate the plasmid pET-mNrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A</sup>. All sequences were verified by automated sequencing. For the *in vivo* ubiquitination assays, the polyhistidine tag was removed from pcDNA3.1/V5HisB-mNrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup> and pcDNA3.1/V5HisB-mNrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A</sup> by GeneTailor site-directed mutagenesis with the following pair of primers, which introduced a STOP codon in front of the 6-histidine-coding sequence: forward, 5'-TCGATTCTACGCGTACCGGTTAACATCACCATC-3', and reverse, 5'-ACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAG-3'.

**Luciferase assays.** Transient transfections of HEK293T cells were performed with the expression vectors for renilla (Promega, Madison, CA) and 3 $\times$ ARE-Luc (a gift of J. Alam, Department of Molecular Genetics, Ochsner Clinic Foundation) as described previously (26). Cells were seeded on 24-well plates (100,000 cells per well), cultured for 16 h, and transfected using calcium phosphate. After 24 h of recovery from transfection, the cells were lysed and assayed for luciferase activity with a dual-luciferase assay system (Promega) according to the manufacturer's instructions. Relative light units were measured in a GloMax 96 microplate luminometer with dual injectors (Promega).

**Immunoblotting.** The primary antibodies used were anti-V5 (Invitrogen, Carlsbad, CA), antihemagglutinin (anti-HA) (Covance, Berkeley, CA), anti-Flag (Sigma Aldrich, Madrid, Spain), anti-Nrf2 (generated by the Hayes laboratory), anti-glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), and anti- $\beta$ -actin and anti-lamin B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Cell lysates were resolved by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Billerica, MA). These membranes were analyzed using the appropriate primary antibodies and peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences).

**Coimmunoprecipitation (co-IP).** A monoclonal antibody from Invitrogen (catalog no. 37-3400) was used to immunoprecipitate  $\beta$ -TrCP, whereas "in-house" polyclonal antibodies were used to immunoprecipitate Nrf2. Cells were washed once with cold phosphate-buffered saline (PBS) and harvested by centrifugation at 1,100 rpm for 10 min. The cell pellet was resuspended in 0.45 ml of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml leupeptin). Five microliters of the anti-Flag antibody (Sigma) or anti-V5 (Invitrogen) was added per lysate, and after incubation for 2 h at 4°C in a rotating wheel, gamma-bind Sepharose-protein G was added (Amersham Biosciences), followed by incubation for 1 h at 4°C. A lysate from nontransfected cells was incubated only with G protein to control for nonspecific binding (data not shown). The complexes were harvested by centrifugation and washed first with lysis buffer (washing buffer 1), second with washing buffer 2 (50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 500 mM NaCl, 1% NP-40, 0.05% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1  $\mu$ g/ml leupeptin), and finally with washing buffer 3 (50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 1% NP-40, 0.05% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml leupeptin). The samples were boiled, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted. Mouse IgG TrueBlot (eBiosciences) was used as a peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000 dilution) because it reduces interference by the 55-kDa heavy and 23-kDa light chains of the immunoprecipitating antibody. In control experiments (not shown), it was established that anti-V5 antibodies did not recognize Flag-tagged proteins and that anti-Flag antibodies did not recognize V5-tagged proteins.

**In vitro kinase assays.** *In vitro* phosphorylation was performed using as a substrate bacterially expressed His-tagged Nrf2, isolated using the ProBond purification system (Invitrogen). GSK-3 $\beta$  kinases were obtained by HA immunoprecipitation of whole-cell lysates of HEK293T cells that had been transfected with HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 216F</sup>, HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>, or HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9A</sup>. For *in vitro* phosphorylation studies, the substrate (0.5  $\mu$ g) was incubated with the kinase and 5  $\mu$ Ci of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP in 25  $\mu$ l of reaction buffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M ATP in 40 mM morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), pH 7.0, and 1 mM EDTA) for 30 min at 30°C with continuous shaking. Kinase reactions were resolved by SDS-PAGE, transferred to Immobilon-P membranes, and exposed to autoradiography. For preparation of phospho-Nrf2 substrate for *in vitro* ubiquitination assays, recombinant Nrf2 was submitted to the same conditions without inclusion of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. The substrate (0.5  $\mu$ g) was incubated with 5 ng of active recombinant GSK-3 $\beta$  (Upstate Biotechnology) per reaction in 25  $\mu$ l of reaction buffer

for 1 h at 30°C with continuous shaking. One microliter of these reaction mixtures was used for the *in vitro* ubiquitination assay.

**Analysis of mRNA levels by real-time quantitative PCR.** Cells were plated on 60-mm dishes, and total cellular RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). Equal amounts (1  $\mu$ g) of RNA from each treatment were reverse transcribed for 75 min at 42°C using 5 U of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) in the presence of 20 U of RNAsin (Promega). Quantitative PCR was performed with 20 ng of cDNA in a 25- $\mu$ l reaction mixture that contained 0.3  $\mu$ M primers and nucleotides, buffer, and *Taq* polymerase within the SYBR green I master mix (PE Applied Biosystems). Amplification was conducted in a 48-well Step One real-time PCR system (PE Applied Biosystems). PCR cycles proceeded as follows: initial denaturation for 10 min at 95°C and then 40 cycles of denaturation (15 s, 95°C), annealing (30 s, 60°C), and extension (30 s, 60°C). Primers were as follows: mNrf2 forward, 5'-ATCCAGACAGACACCACTGGATC-3', and reverse, 5'-GGCAGTGAAGACTGAACCTTTCA-3'; hNrf2 forward, 5' TCAGCATGCTACGTGATGAAG-3', and reverse, 5'-TTTGCTGCAGGGAGTATT CA-3';  $\beta$ -actin forward, 5'-TCTTCTCTGGGCATGGAG-3', and reverse, 5'-AGGAGGAGCAATGATCTTGATCTT-3'. The gene expression primer and probe mixtures for  $\beta$ -TrCP1 and  $\beta$ -TrCP2 were Mm00477680\_ml and Mm00460241\_ml, respectively, purchased from ABI. The melting-curve analysis showed the specificity of the amplifications. The threshold cycle ( $C_T$ ), which inversely correlates with the target mRNA level, was measured as the cycle number at which the reporter fluorescent emission appeared above the background threshold (data not shown). To ensure that equal amounts of cDNA were added to the PCR mixture, the  $\beta$ -actin housekeeping gene was coamplified. Data analysis was based on the  $\Delta C_T$  method with normalization of the raw data to housekeeping genes as described in the manufacturer's manual (Applied Biosystems). All PCRs were performed in triplicate.

***In vitro* ubiquitination assay.** Purified recombinant proteins for  $\beta$ -TrCP-dependent ubiquitination were kindly provided by N. W. Pierce and R. J. Deshaies (Howard Hughes Medical Institute, Division of Biology, Pasadena, CA). Ubiquitination reactions were carried out as described previously (35) and contained ATP (2 mM), ubiquitin (30  $\mu$ M), E1 (1  $\mu$ M), Cdc34b (5  $\mu$ M), SCF $\beta$ -TrCP (450 nM), and unphosphorylated or phosphorylated Nrf2 (20 ng) in ubiquitination buffer (30 mM Tris [pH 7.6], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dithiothreitol [DTT], 100 mM NaCl). Prior to the ubiquitin reactions, E1, Cdc34b, and ubiquitin were incubated together for 2 min to allow E2 thioester formation. Reaction mixtures were incubated for 1 h at 25°C and quenched with SDS-PAGE buffer (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 12.5% [vol/vol] glycerol, 2% [wt/vol] SDS, 0.06% [wt/vol] bromophenol blue, 0.04% [vol/vol] 2-mercaptoethanol). Ubiquitination reactions were resolved by SDS-PAGE, followed by transfer to Immobilon-P membranes. Ubiquitinated proteins were detected with an antiubiquitin antibody (Chemicon, Millipore).

***In vivo* ubiquitination assay.** An *in vivo* ubiquitination assay was carried out using the method of Treier et al. (45). HEK293T cells were transfected with pHisUb along with the indicated plasmids. Approximately 24 h later, the transfected cells were washed with prewarmed phosphate-buffered saline and scraped into 0.4 ml of phosphate-buffered saline. A whole-cell lysate was prepared from 80  $\mu$ l of the cell suspension and is referred to as the "input" fraction. His-tagged protein was purified from the remainder of the cell suspension as follows: the cell suspension was lysed by the addition of 1 ml of buffer A (6 M guanidine-HCl, 10 mM Tris in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0) supplemented with 5 mM imidazole. The resulting lysate was sonicated to reduce viscosity before 60  $\mu$ l of ProBond TM resin (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added, and the mixture was rotated for 4 h at 25°C. Thereafter, the beads were washed sequentially with buffer A supplemented with 0.1% (vol/vol) Triton X-100, buffer B (8 M urea, 10 mM Tris in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0) supplemented with 0.1% Triton X-100, buffer C (8 M urea, 10 mM Tris in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5) supplemented with 0.2% Triton X-100, and finally buffer C supplemented with 0.1% Triton X-100. Bound material was eluted from the beads by suspension in 50  $\mu$ l of modified Laemmli sample buffer (20 mM Tris-Cl, pH 6.8, 10% [vol/vol] glycerol, 0.8% [wt/vol] SDS, 0.1% [wt/vol] bromophenol blue, 0.72 M 2-mercaptoethanol, and 300 mM imidazole), followed by boiling for 4 min. The suspension was centrifuged (16,000  $\times$  g, 1 min, 20°C), and the resulting supernatant was collected and is referred to as the "pulldown" fraction.

**siRNA assays.** The short interfering RNA (siRNA) used to knock down human GSK-3 $\alpha$  or GSK-3 $\beta$  expression and the control scrambled siRNA sequence were purchased from Ambion Inc.: siRNA identifier (ID) s6236 for GSK-3 $\alpha$  and siRNA ID s6241 for GSK-3 $\beta$  (Applied Biosystems). The siRNA used to knock down  $\beta$ -TrCP1 was from Thermo Scientific, Dharmacon (catalog no. L-044048-00-0005), and that used to knock down  $\beta$ -TrCP2 was from Applied Biosystems (catalog no. 175927). Briefly, HEK293T cells were seeded in 6-well

plates (200,000 cells/well in 2 ml medium) before being transfected using calcium phosphate and the appropriate Nrf2 expression plasmids. To knock down GSK-3 isoforms, we performed siRNA transfection during two consecutive days. On the first day, we knocked down GSK-3 using 80 ng of Silencer Select validated siRNA with 30  $\mu$ l of siPORT Amine reagent, and on the second day we used 40 ng of Silencer Select validated siRNA with 15  $\mu$ l of siPORT Amine reagent. Twenty-four hours later, the cells were collected and Nrf2 and GSK-3 levels were analyzed.

**Analyses of protein stability by pulse-labeling.** HEK293T cells were plated ( $2 \times 10^6$  cells/100-mm plate previously covered with poly-D-Lys) and transfected with the indicated plasmids. The following day, cells were washed (2 $\times$ ) with pulse-labeling medium (methionine-free, cysteine-free Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% dialyzed fetal bovine serum and 80 mg/ml gentamicin). Then, cells were incubated at 37°C for 30 min. The medium was removed and replaced with pulse-labeling medium containing 0.5 mCi/ml [<sup>35</sup>S]methionine (NEG 772 EasyTag Express protein labeling mix from Perkin Elmer). After proteins were labeled for 60 min, the medium was removed and the cells were washed twice with complete DMEM supplemented with 2 mM cysteine and 2 mM methionine (20-fold molar excess) for the appropriate times except for the "zero" samples. The zero points were rapidly washed with cold phosphate-buffered saline and lysed by the addition of radioimmune precipitation assay buffer (25 mM Tris-HCl [pH 7.6], 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml leupeptin). The cell lysates were diluted 10-fold with IP buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM; NaCl, 137 mM; NaF, 20 mM; sodium pyrophosphate, 1 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM; Nonidet P-40, 1%; glycerol, 10%; phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM; and leupeptin, 1  $\mu$ g/ml) and sonicated (3 $\times$  for 30 s each). Thereafter, the soluble portion of the lysates was prepared by centrifugation at 10,000  $\times$  g for 5 min at 4°C and retained for analysis. For immunoprecipitation, cell lysates were incubated with 3  $\mu$ l of anti-V5 at 4°C with continuous rotation. After 2 h, a 20- $\mu$ l slurry of protein G-Sepharose was added, and incubation was continued for an additional 1 h. Immunocomplexes were pelleted by centrifugation, washed three times in IP buffer, and resuspended in 40  $\mu$ l of Laemmli sample buffer containing 1%  $\beta$ -mercaptoethanol. The samples were boiled, subjected to electrophoresis, and transferred to Immobilon-P membranes. After autoradiography, the blot was incubated with anti-V5 antibody to normalize the amount of Nrf2 protein per lane.

**Image analyses and statistics.** Different band intensities (density arbitrary units), corresponding to immunoblot detection of protein samples, were quantified using the MCID software program (MCID, Cambridge, United Kingdom). Student's *t* test was used to assess differences between groups; a *P* value of <0.05 was considered significant. Unless indicated, all experiments were performed at least three times with similar results. The values in the graphs correspond to the means for at least three samples. Error bars indicate standard deviations.

## RESULTS

**GSK-3 modulates Nrf2 protein levels.** We first measured the levels of Nrf2 protein in HEK293T cells that had been treated with the two prototypic Nrf2 inducing agents, tBHQ (*tert*-butylhydroquinone) (15  $\mu$ M, 6 h) and SFN (sulforaphane) (10  $\mu$ M, 6 h), or the GSK-3 inhibitor SB216763 (20  $\mu$ M, 6 h). As shown in Fig. 1A, under these conditions both tBHQ and SFN modestly increased the level of Nrf2 protein but had no effect on the level of  $\beta$ -catenin, which was used as a control for inhibition of GSK-3. Interestingly, SB216763, which increased  $\beta$ -catenin levels, also augmented the level of Nrf2 protein to an extent similar to that when HEK293T cells were treated with either tBHQ or SFN alone. Moreover, cotreatment with SB216763 and either of the two inducing agents resulted in a further elevation in the amount of the Nrf2 protein. mRNA levels for Nrf2 did not differ significantly among treatments (Fig. 1B), indicating that the increase in the Nrf2 protein produced by tBHQ, SFN, and SB216763 was not accompanied by upregulation of the *Nrf2* gene (Fig. 1B).

The increase in the Nrf2 protein correlated with higher transactivation activity as determined with an ARE-driven luciferase reporter construct, 3 $\times$ ARE-Luc, created from the



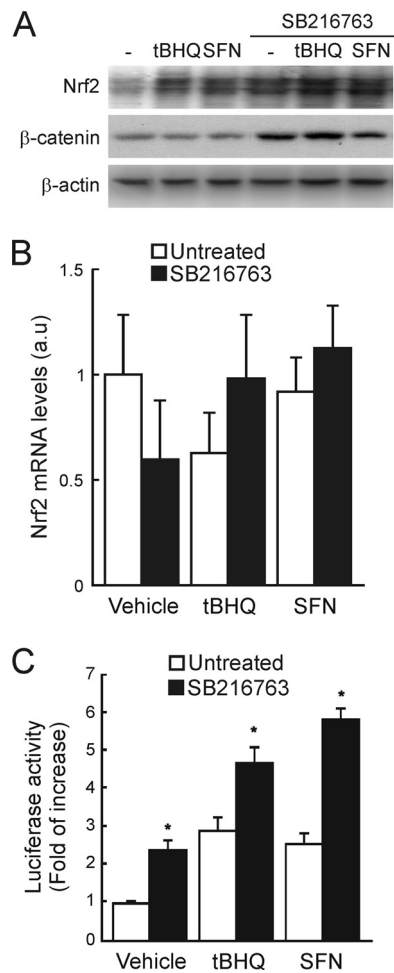


FIG. 1. GSK-3 modulates Nrf2 levels. (A) HEK293T cells were maintained in low-serum medium (0.5% FBS) for 16 h before finally being treated with 15  $\mu$ M tBHQ, 10  $\mu$ M SFN, or 20  $\mu$ M SB216763 for 6 h. Upper blot, Nrf2 immunodetection in cell lysates; middle blot,  $\beta$ -catenin levels as a control for GSK-3 inhibition; lower blot,  $\beta$ -actin levels showing similar protein loads per lane. (B) Quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR) determination of mRNA of Nrf2 normalized by  $\beta$ -actin from HEK293T cells treated as in panel A (expressed in arbitrary units). Variations are not statistically significant. (C) HEK293T cells were transfected with the 3 $\times$ ARE-LUC and renilla control vectors, and after transfection the cells were treated with 3  $\mu$ M tBHQ, 3  $\mu$ M SFN, or 20  $\mu$ M SB216763 for 16 h before luciferase activity was measured. Asterisks denote statistically significant differences between the untreated and SB216763-treated groups according to a Student *t* test.

mouse *ho-1* promoter. HEK293T cells were transfected with 3 $\times$ ARE-Luc, and after overnight recovery, they were stimulated for 16 h with tBHQ (3  $\mu$ M), SFN (3  $\mu$ M), or SB216763 (20  $\mu$ M). As shown in Fig. 1C, tBHQ and SFN increased reporter gene activity between 2.5- and 3.0-fold. Inhibition of GSK-3 with SB216763 yielded a similar 2.5-fold increase. Moreover, combined treatment of either tBHQ or SFN with SB216763 led to a cooperative increase in luciferase activity of about 5.0-fold.

**Nrf2 protein levels are regulated by GSK-3 in a Keap1-independent manner.** In order to determine if Keap1 might have a role in the GSK-3-dependent increase in the Nrf2 pro-

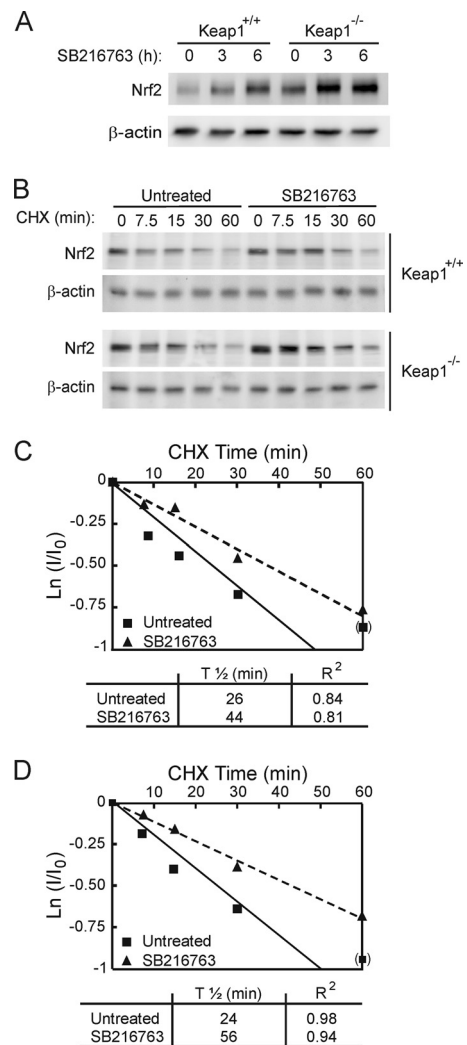


FIG. 2. GSK-3 inhibition promotes Nrf2 protein accumulation in a Keap1-independent manner. (A) MEFs from Keap1-deficient (Keap1<sup>-/-</sup>) or wild-type (Keap1<sup>+/+</sup>) littermates were maintained in low-serum medium for 16 h and then treated with 20  $\mu$ M SB216763 for the times indicated. Upper blot, total Nrf2 protein levels; lower blot,  $\beta$ -actin levels showing that similar amounts of protein were loaded per lane. (B) MEFs were maintained in low-serum medium for 16 h and then treated with 20  $\mu$ M SB216763 for 2 h prior to inhibition of protein synthesis with 40  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX). Whole-cell lysates were prepared at the indicated times after addition of CHX. Upper blots, Nrf2 protein levels in Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> fibroblasts. Lower blots,  $\beta$ -actin levels showing similar protein loaded per lane from Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> fibroblasts. (C and D) Both graphs depict the natural logarithm of the relative levels of the Nrf2 protein as a function of CHX chase time in Keap1<sup>+/+</sup> (C) or Keap1<sup>-/-</sup> (D) cells. The protein half-life has been determined in the linear range of the degradation curve.

tein, we used MEFs derived from Keap1<sup>-/-</sup> mice and from Keap1<sup>+/+</sup> littermates as a control. Treatment of Keap1<sup>+/+</sup> MEFs with SB216763 (20  $\mu$ M for 3 or 6 h) increased the basal level of the Nrf2 protein in a time-dependent manner (Fig. 2A); these results resemble those shown in Fig. 1. As expected, we found that the baseline Nrf2 protein level in Keap1<sup>-/-</sup> MEFs was higher than that in their wild-type counterparts. More importantly, SB216763 also increased the level of the

Nrf2 protein in *Keap1*<sup>-/-</sup> MEFs, suggesting that an elevation of Nrf2 upon GSK-3 inhibition is not dependent on the Keap1 degradation pathway. The data reported for SB216763 (50% inhibitory concentration [IC<sub>50</sub>], 34 nM) were similar to those obtained using another potent and specific GSK-3 inhibitor, CT99021 (IC<sub>50</sub>, 10 nM) (data not shown).

In order to analyze if Nrf2 protein accumulation was due to an increase in its stability, we measured the half-life of Nrf2 in both MEF lines; densitometric analysis was validated using a sample dilution curve to ensure that the signal lay in the linear range (data not shown). MEFs were first treated with either SB216763 (20  $\mu$ M) or vehicle for 2 h, and then protein synthesis was inhibited using CHX (40  $\mu$ g/ml). Cells cotreated with SB216763 and CHX presented a delayed Nrf2 degradation curve compared to cells treated with CHX alone (Fig. 2B, C, and D). Thus, the half-life of Nrf2 increased from 26.5 min to 44.5 min in *Keap1*<sup>+/+</sup> cells and from 24.4 min to 55.6 min in *Keap1*<sup>-/-</sup> fibroblasts in the presence of SB216763. Taken together, these results indicate that GSK-3 modulates Nrf2 levels through a Keap1-independent mechanism.

As an additional approach, we compared the levels of ectopically expressed V5-tagged wild-type Nrf2 with those of the V5-tagged mutant Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>, which cannot be turned over in a Keap1-dependent fashion. As shown in Fig. 3A and C, SB216763 produced a time-dependent accumulation of both Nrf2-V5 and Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 (at 3 h and 6 h), as well as  $\beta$ -catenin, which was used as an internal control for GSK-3 inhibition. To test whether GSK-3 $\alpha$  and/or GSK-3 $\beta$  might be responsible for the increase in Nrf2, we knocked down each isoform using siRNA. HEK293T cells were first transfected with an expression vector for Nrf2-V5 or Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 before being transfected subsequently with siRNA against either GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , or both isoforms. Knockdown of either isoform (by 70 to 80% according to densitometric analysis; not shown) resulted in a substantial increase in the levels of the Nrf2-V5 and Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 proteins (Fig. 3B and D). These results complement the observations made with the GSK-3 inhibitor and further indicate that Nrf2 stability is regulated by GSK-3.

**Degradation of Nrf2 by the E3 ubiquitin ligase SCF/ $\beta$ -TrCP complex.** Using bioinformatics, we found that Nrf2 contains an evolutionarily conserved sequence that resembles the consensus motif for substrate recognition by  $\beta$ -TrCP [K(X)<sub>n</sub>DSG(X)<sub>1-4</sub>S, where X is any residue]; in mouse Nrf2, this consensus sequence is located between amino acids 322 and 338 (Fig. 4A). It appears to be present in all vertebrate Nrf2 proteins except that of chicken, which contains the “DSG(X)<sub>1-4</sub>S” core sequence but lacks adjacent N-terminal lysine residues at the positions where it is found in mouse or human Nrf2. In this regard, chicken Nrf2 is similar to hSnail and hYAP. A comparison between this conserved DSGIS sequence in mammalian Nrf2 with those in proteins that are known to interact with  $\beta$ -TrCP indicates that it is most similar to those found in hEpoR and hYAP; these last two proteins possess just a Gly-Ile or Gly-Leu dipeptide between the two serine residues in the core consensus sequence.

To determine the significance of the putative  $\beta$ -TrCP recognition motif in Nrf2, we measured the levels of the Nrf2 protein in *Keap1*<sup>-/-</sup> MEFs after knockdown of the  $\beta$ -TrCP1 and/or -2 isoform. As shown in Fig. 4B and C, fibroblasts transfected with siRNA against  $\beta$ -TrCP1 and/or -2 exhibited

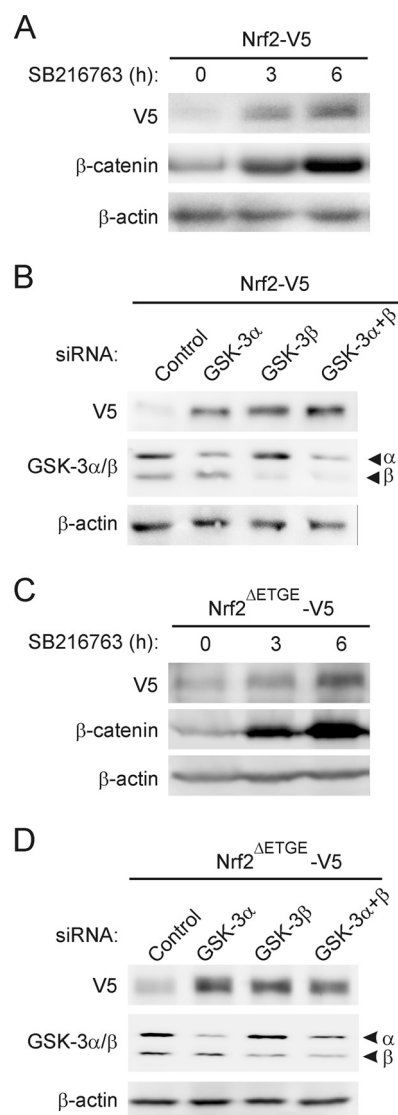


FIG. 3. Modulation of Nrf2 protein levels by GSK-3 is independent of Keap1. (A and C) HEK293T cells were transfected with either V5-tagged Nrf2, the wild type, or the Keap1-insensitive Nrf2 version (Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5), maintained in low-serum medium for 16 h, and then treated with 20  $\mu$ M SB216763 for the indicated times. Upper blots, Nrf2-V5 (A) or Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 (C) protein levels; middle blots,  $\beta$ -catenin levels in the same cell lysates as a control for GSK-3 inhibition; lower blots,  $\beta$ -actin levels showing similar protein loads per lane. (B and D) HEK293T cells were transfected with either Nrf2-V5 (B) or Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 (D). After 24 h they were further transfected with siRNAs for GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , or both or with a control scrambled siRNA as explained in Materials and Methods. Cells were lysed 24 h after siRNA transfection. Upper blots, Nrf2-V5 (B) or Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 (D) protein levels; middle blots, GSK-3 $\alpha$  and - $\beta$  protein levels; lower blots,  $\beta$ -actin levels showing that similar amounts of protein were loaded in each lane.

higher levels of the Nrf2 protein than cells transfected with control siRNA. These results indicate that both  $\beta$ -TrCP isoforms are involved in the regulation of Nrf2 in a Keap1-independent manner and support the hypothesis that a  $\beta$ -TrCP destruction motif exists in Nrf2.

In another set of experiments, we used a dominant-negative

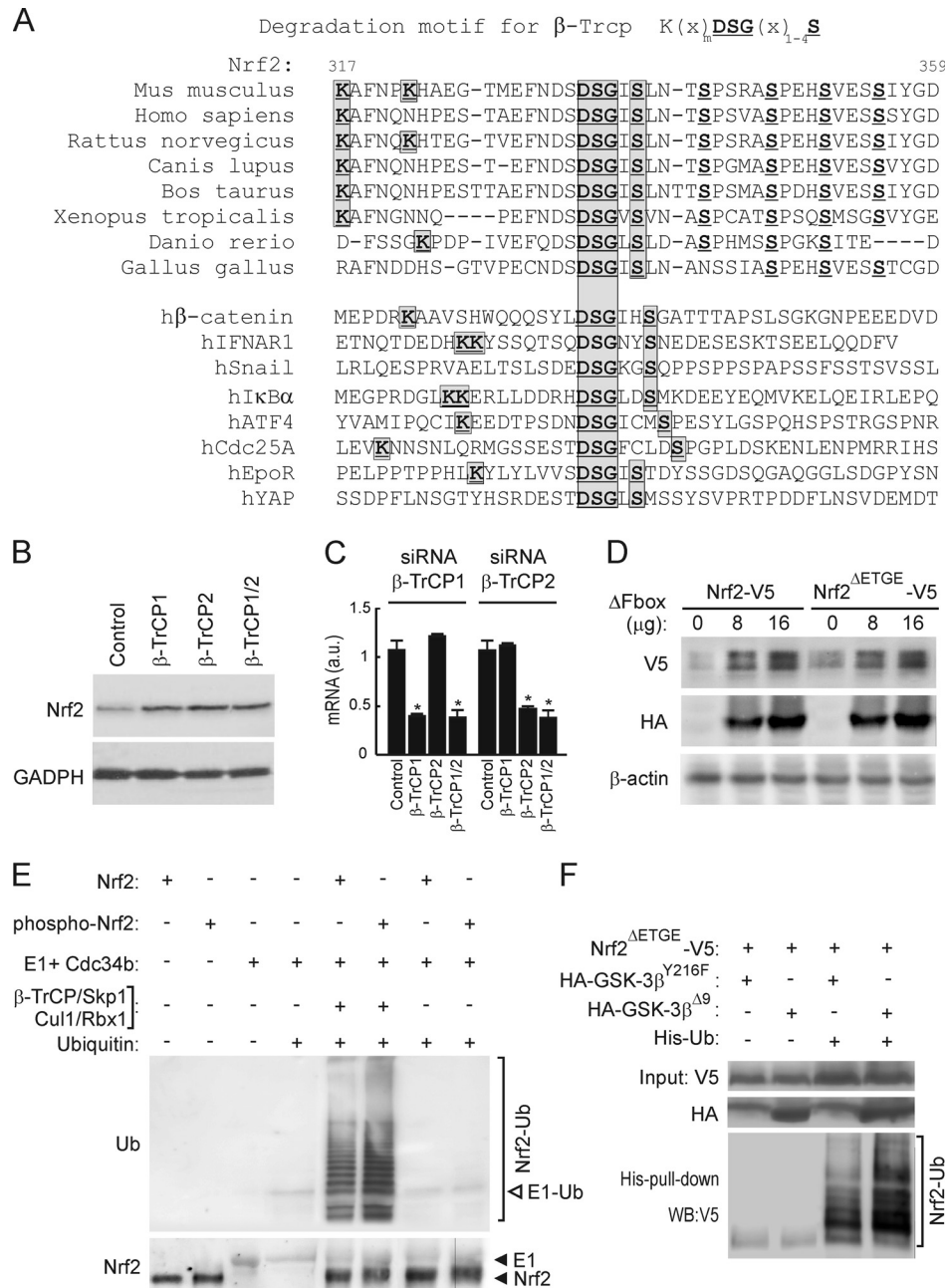


FIG. 4. Nrf2 is regulated by the E3 ligase  $\beta$ -TrCP complex through a destruction motif within its Neh6 domain. (A) Upper panel of sequences, primary structure of Nrf2 between residues 317 and 359 in the murine protein. The bold/underlined residues correspond to the putative site of phosphorylation by GSK-3, and the boxed ones correspond to the  $\beta$ -TrCP consensus motif. Lower panel of sequences, alignment of different well-known  $\beta$ -TrCP substrates showing the consensus sequence of the degradation motif. (B) Keap1<sup>-/-</sup> MEFs were transfected with siRNA against  $\beta$ -TrCP1 and/or  $\beta$ -TrCP2 as described in Materials and Methods. Upper blot, Nrf2 total protein levels; lower blot, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) levels showing similar protein loads per lane. (C) Quantitative RT-PCR determination of mRNA for  $\beta$ -TrCP1 and  $\beta$ -TrCP2 normalized by  $\beta$ -actin from MEFs transfected as in panel B. Asterisks denote statistically significant differences with  $P < 0.05$ . (D) HEK293T cells were cotransfected with the Nrf2-V5 or Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>-V5 expression vector and the indicated amounts of the  $\beta$ -TrCP dominant-negative ( $\beta$ -TrCP <sup>$\Delta$ Fbox</sup>-HA) mutant and then maintained in low-serum medium for 16 h. Whole-cell lysates were immunoblotted against anti-V5 antibody (upper blot) or anti-HA antibody (middle blot) or with anti- $\beta$ -actin antibody showing similar amounts of protein per sample (lower blot). (E) *In vitro* ubiquitination of Nrf2 by the  $\beta$ -TrCP complex. Bacterially expressed His-tagged Nrf2 was submitted to an *in vitro* kinase assay in the absence (Nrf2) or presence (phospho-Nrf2) of recombinant GSK-3 $\beta$ . Nrf2 and phospho-Nrf2 (20 ng) were incubated at 25°C for 1 h with purified ubiquitin, E1/cdc34b,  $\beta$ -TrCP/Skp1, and Cul1/Rbx1 as indicated. Polyubiquitinated Nrf2 was detected by immunoblotting with antiubiquitin antibody. Upper blot, antiubiquitin. E1-Ub, monoubiquitinated E1. Lower blot, anti-Nrf2 showing similar amounts of substrate loaded per lane. (F) p100 dishes of HEK293T cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection (24 h), a whole-cell lysate (input) and an affinity-purified His-tagged fraction (His-pull-down) were blotted with anti-V5 antibody. Upper blot, anti-V5 input; middle blot, ectopically expressed HA-tagged GSK-3 $\beta$ ; lower blot, anti-V5 detection in the His pull-down fraction. The bracket indicates the mobility of polyubiquitinated Nrf2-V5 (Nrf2-Ub) forms.

mutant of SCF/β-TrCP. We cotransfected HEK293T cells with expression constructs for Nrf2-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5, along with a dominant-negative β-TrCP<sup>ΔFbox</sup>-HA mutant, which lacks the Fbox motif and cannot form functional SCF complexes. The presence of β-TrCP<sup>ΔFbox</sup>-HA led to accumulation of both Nrf2-V5 and Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 (Fig. 4D), further indicating that β-TrCP participates in the degradation of Nrf2.

Initial evidence that Nrf2 is ubiquitinated in a β-TrCP-dependent manner was obtained from *in vitro* ubiquitination assays. Bacterially expressed His-tagged Nrf2 was subjected to an *in vitro* kinase assay (see below) in the absence or presence of recombinant GSK-3β and used as the substrate in an *in vitro* ubiquitination assay. As shown in Fig. 4E, Nrf2 was polyubiquitinated only in the presence of the complete β-TrCP-E3 ligase complex. Moreover, phospho-Nrf2 incorporated about 2-fold more ubiquitin than nonphosphorylated Nrf2. These results suggest that Nrf2 is a substrate for the β-TrCP ligase complex and pave the way for further analysis of this new mechanism of regulation.

Next, we studied the connection between β-TrCP-dependent regulation of Nrf2 stability and GSK-3. HEK293T cells were cotransfected with plasmids expressing Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 and either the control empty vector or an expression vector for His-tagged ubiquitin (His-Ub). These cotransfection experiments also included expression vectors for either the inactive kinase HA-GSK-3β<sup>Y216F</sup>, containing a single Tyr216-to-Phe mutation in its activation loop, or the constitutively active HA-GSK-3β<sup>Δ9</sup>, which lacks the first 9 N-terminal residues, including Ser9, and is insensitive to downregulation by Akt phosphorylation. The amount of His-Ub bound to Nrf2 was measured in a pulldown assay that employed nickel columns (Fig. 4F). Protein recovered in the His-tagged fraction represented the polyubiquitinated transcription factor, since no such protein was recovered in this fraction unless Nrf2 and His-Ub were coexpressed. Interestingly, we could detect more highly polyubiquitinated Nrf2 forms in cells overexpressing HA-GSK-3β<sup>Δ9</sup> than in HA-GSK-3β<sup>Y216F</sup>-expressing cells. Overall, these results are consistent with the notion that β-TrCP plays a role in Nrf2 degradation.

**GSK-3β participates in phosphorylation of serine residues within the β-TrCP destruction motif.** The β-TrCP recognition motif, along with adjacent C-terminal residues, contains a number of possible GSK-3 phosphorylation sites (Fig. 4A). To examine whether the β-TrCP motif is regulated by GSK-3β, we first analyzed whether bacterially expressed His-tagged mouse Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-HisB and mouse Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-HisB, in which all Ser residues at positions 335, 338, 342, 347, 351, and 355 had been changed to Ala, could be phosphorylated by GSK-3 *in vitro*. Kinase reactions were carried out using two constitutively active mutants of GSK-3β which lack pseudosubstrate inhibitory activity: the first mutant, HA-GSK-3β<sup>Δ9</sup>, contained a deletion of 9 N-terminal residues, including Ser9; the second mutant, HA-GSK-3β<sup>S9A</sup>, contained a single Ser9-to-Ala mutation. As shown in Fig. 5A, both Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-HisB and Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-HisB were phosphorylated *in vitro* by the two GSK-3β active mutants. However, Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-HisB was phosphorylated to a much lesser extent than Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-HisB, implying that GSK-3 phosphorylates at least some of the Ser residues in Nrf2 that are located immediately to the C-terminal side of the β-TrCP motif (see Discussion). Similar results were

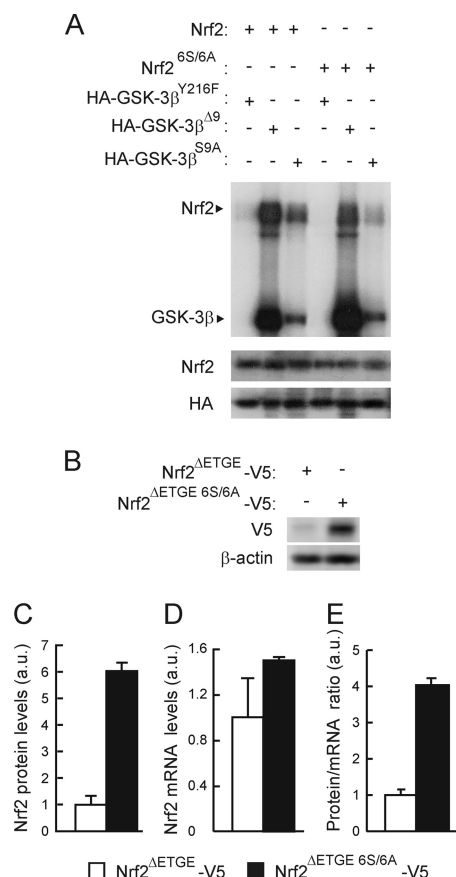


FIG. 5. Mutation of 6S to A in the Neh6 domain of Nrf2 reduces its phosphorylation by GSK-3β. (A) Representative *in vitro* kinase assay on recombinant Nrf2 or Nrf2<sup>6S/6A</sup> proteins with HA-tagged GSK-3β immunoprecipitated from HEK293T cells transfected with either the inactive HA-GSK-3β<sup>Y216F</sup> mutant or the constitutively active HA-GSK-3β<sup>Δ9</sup> or HA-GSK-3β<sup>S9A</sup> mutant. Upper blot, immunocomplex kinase assay; middle blot, immunodetection of Nrf2 to ensure similar quantity per reaction; lower blot, immunoblot with anti-HA antibody showing similar amount of GSK-3β per assay. (B) Basal levels of Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5 in HEK293T-transfected cells. Upper blot, anti-V5; lower blot, β-actin. (C) Densitometric quantification of representative blots from panel B. (D) Nrf2 mRNA levels analyzed by quantitative RT-PCR from cells transfected as in panel B. (E) Graph depicts the ratio between Nrf2 protein and mRNA levels as shown in panels C and D.

obtained with recombinant GSK-3β (data not shown); the inactive HA-GSK-3β<sup>Y216F</sup> was unable to phosphorylate Nrf2 under the same purification conditions, thereby excluding the possibility that a contaminating kinase in the reaction mixture might be responsible for modifying Nrf2.

To determine if phosphorylation of the serine cluster in Nrf2 between amino acids 335 and 355 affects its β-TrCP-directed proteasomal degradation, we compared the levels of Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 and Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5 following their forced expression in HEK293 cells. Mutation of these Ser residues resulted in larger amounts of ectopic Nrf2 being observed without significant changes in their mRNA levels (Fig. 5B to E). Interestingly, the Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5 mutant exhibited a faster mobility during SDS-PAGE than Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 (Fig. 5B); we attribute this variation to changes in the molecular



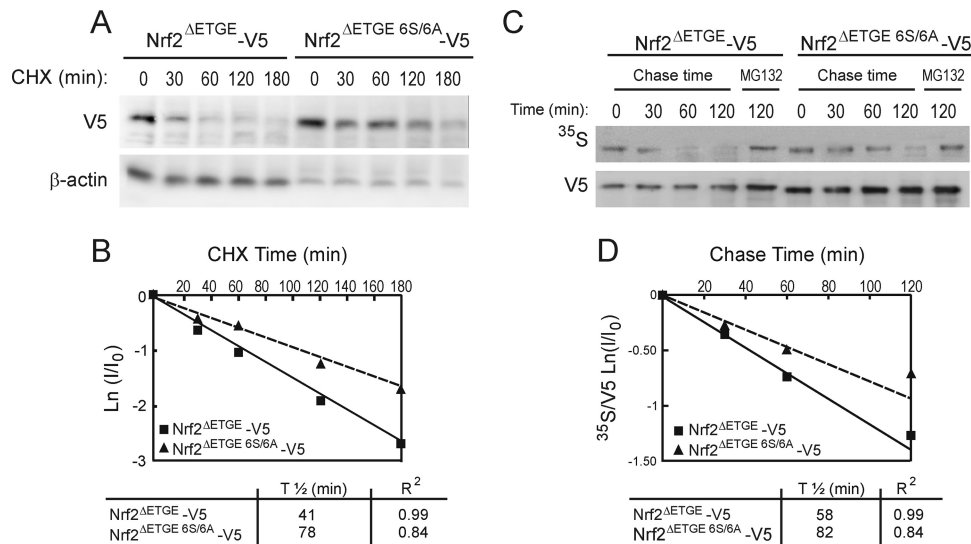


FIG. 6. Mutation of the 6S cluster within the Neh6 domain increases Nrf2 protein stability. (A) HEK293T cells were transfected with Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE</sup> 6S/6A-V5, serum starved for 16 h, and finally subjected to protein synthesis inhibition with 100 μg/ml CHX. Whole-cell lysates were prepared at the indicated times after addition of CHX. Upper blot, Nrf2-V5 protein levels. Lower blot, β-actin levels showing similar protein loads per lane. (B) The graph depicts the natural logarithm of the relative levels of the Nrf2-V5 protein as a function of CHX chase time. The protein half-life was determined using the linear part of the degradation curve. (C) HEK293T cells were transfected with Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE</sup> 6S/6A-V5, serum starved for 16 h, and then subjected to [<sup>35</sup>S]methionine/cysteine labeling for 1 h. Then, cells were incubated in high-methionine- and cysteine-containing medium and collected at the indicated times. For the 120-min time point, the cells were treated with MG132 as an internal control. Upper blot, <sup>35</sup>S autoradiography; lower blot, anti-V5 antibody. (D) The graph shows the natural logarithm of the relative levels of Nrf2 as a function of <sup>35</sup>S chase time. The half-life has been determined in the linear range of the degradation curve.

mass of the polypeptide (104 Da for the six Ser-to-Ala substitutions) and a concomitant failure to phosphorylate the mutant protein.

By blocking translation of mRNA using CHX, we examined whether the 6-Ser cluster influenced the half-life of the Nrf2 protein. HEK293T cells were transfected with Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE</sup> 6S/6A-V5 and exposed to CHX (40 μg/ml) for various periods of time. As shown in Fig. 6A and B, mutation of the six Ser residues led to an approximately 2.0-fold increase in the half-life of Nrf2. Similar results were obtained with an Nrf2<sup>ΔETGEΔNeh6</sup>-V5 plasmid used as a control (29; also data not shown). Additional experiments were performed to investigate the stability of Nrf2 using the [<sup>35</sup>S]methionine pulse-chase assay. As shown in Fig. 6C and D, estimation of half-life for these mutants paralleled the results obtained with CHX experiments.

**Nrf2 lacking the 6S cluster in its Neh6 domain is insensitive to GSK-3-induced degradation.** The relevance of the β-TrCP motif and its associated Ser residues to GSK-3-stimulated degradation of Nrf2 was analyzed by treating cells that had been transfected with either Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE</sup> 6S/6A-V5 with SB216763 for 3 h or 6 h. As expected, inhibition of GSK-3 resulted in the accumulation of Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 (Fig. 7A). In contrast, treatment with SB216763 did not increase the amount of the Nrf2<sup>ΔETGE</sup> 6S/6A-V5 protein. In addition, we used siRNAs against GSK-3α, GSK-3β, or both isoforms in HEK293T cells that had been transfected previously with expression vectors for either Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE</sup> 6S/6A-V5. Knockdown of either GSK-3α or GSK-3β (by 70 to 80% according to densitometric analysis; not shown) led to an increase in the amount of Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5. In contrast, knock-

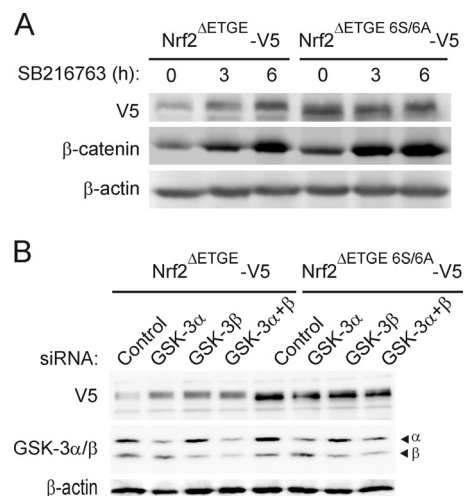


FIG. 7. Mutation of the 6S cluster within the Neh6 domain renders the Nrf2 protein insensitive to GSK-3. (A) HEK293T cells were transfected with Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE</sup> 6S/6A-V5, maintained in low-serum medium for 16 h, and then incubated with 20 μM SB216763 for the indicated times. Upper blot, anti-V5 immunoblot; middle blot, β-catenin levels as a control of GSK-3 inhibition; lower blot, β-actin levels showing the similar protein loads per lane. (B) HEK293T cells were transfected with either Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE</sup> 6S/6A-V5. After 24 h they were further transfected with siRNAs for GSK-3α, GSK-3β, or both with a control scramble siRNA as described in Materials and Methods. Cells were lysed 24 h after siRNA transfection. Upper blot, anti-V5 antibody; middle blot, GSK-3α and -β protein levels; lower blot, β-actin levels showing similar protein loads per lane.



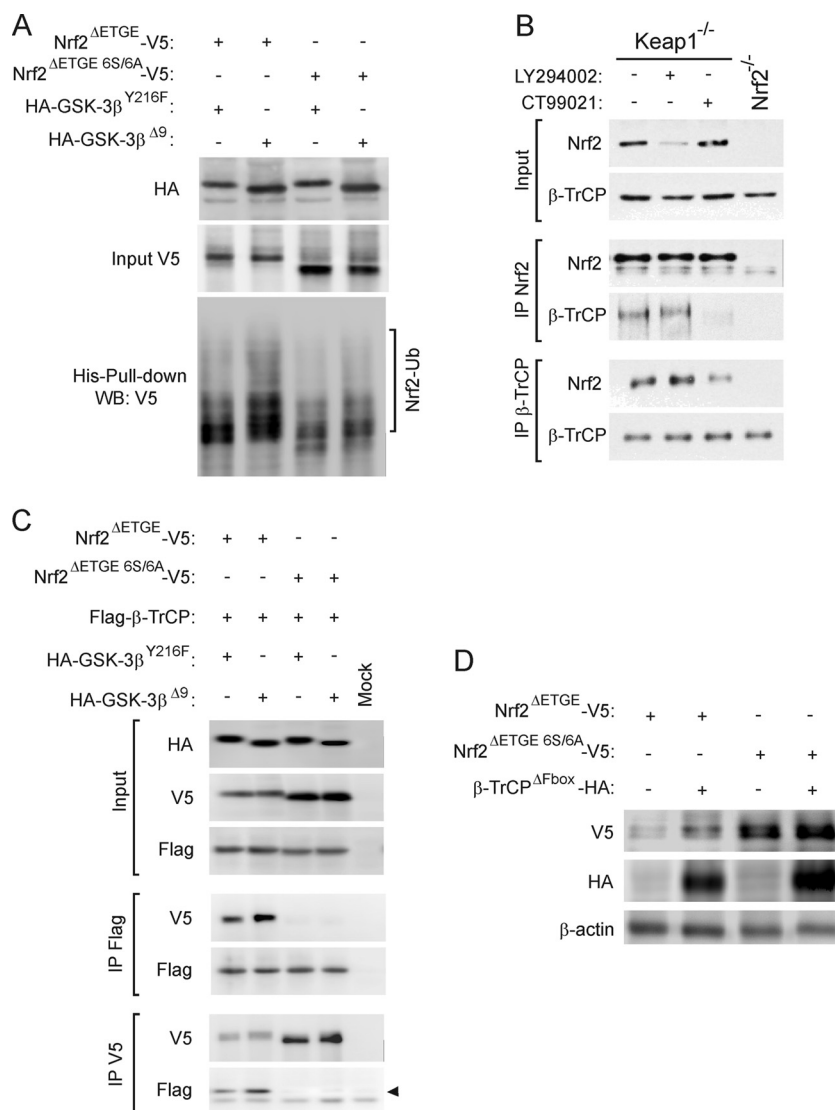


FIG. 8. The 6S cluster within the Neh6 domain is a target of  $\beta$ -TrCP in a GSK-3-dependent manner. (A) p100 dishes of HEK293T cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection (24 h), a whole-cell lysate (input) and an affinity-purified His-tagged fraction (His-Pull-down) were blotted with anti-V5 antibody. Upper panel, anti-V5 input detection; middle panel, ectopically expressed HA-tagged GSK-3 $\beta$ ; lower panel, anti-V5 detection in His pull-down fractions. The bracket indicates the mobility of polyubiquitinated Nrf2-V5 (Nrf2-Ub) forms. (B) Keap1<sup>-/-</sup> or Nrf2<sup>-/-</sup> MEF cells were serum starved for 6 h before they were treated for a further 2 h with vehicle control, 10  $\mu$ M LY294002, or 5  $\mu$ M CT99021. Thereafter, the fibroblasts that had been subjected to different treatments were harvested separately, and each was lysed in 0.45 ml of buffer. A 50- $\mu$ l portion of the lysate was retained as “input” (labeled on the left), and the remainder was immunoprecipitated with antibodies against either Nrf2 (labeled IP Nrf2) or  $\beta$ -TrCP (labeled IP  $\beta$ -TrCP) using Sepharose-protein G beads. The immunoprecipitated material was analyzed by Western blotting using antibodies against Nrf2 or  $\beta$ -TrCP as indicated to the left of the blots. (C) HEK293T cells were cotransfected with the indicated plasmids or with an empty vector (Mock). One-fifth of whole-protein lysate was used to control for protein expression as shown in the three upper panels. The rest of the protein lysates were immunoprecipitated with anti-Flag or anti-V5 antibodies and immunoblotted as indicated in the four lower panels. The arrow points the specific  $\beta$ -TrCP immunoreactive band. (D) After cotransfection of HEK293T cells with either Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5 and  $\beta$ -TrCP<sup>ΔFbox</sup>-HA, cells were maintained in low-serum medium for 16 h. Upper panel, anti-V5 antibody; middle panel, anti-HA antibody; lower panel, anti- $\beta$ -actin antibody showing a similar protein load.

down of GSK-3 did not alter the levels of the Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5 protein (Fig. 7B). These data show that the six Ser residues within or adjacent to the  $\beta$ -TrCP destruction motif are necessary for the degradation of Nrf2 stimulated by GSK-3.

**The SCF/ $\beta$ -TrCP complex does not promote ubiquitination of Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5.** To gain further information about how  $\beta$ -TrCP negatively regulates Nrf2, we cotransfected HEK293T

cells with expression vectors for Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 or Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5 along with His-Ub and HA-GSK-3β<sup>Y216F</sup> or HA-GSK-3β<sup>Δ9</sup>. The basal amount of ubiquitinated Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5 was smaller than that of Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 (Fig. 8A). It is noteworthy that we still detected ubiquitination of Nrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5, indicating the presence of other possible proteasome degradation motifs apart from those involv-

ing Keap1 and  $\beta$ -TrCP. As expected, HA-GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$  promoted an increase in Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup> ubiquitination, but, in contrast, it did not change the amount of ubiquitinated Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup>.

Since substrate phosphorylation increases the affinity of  $\beta$ -TrCP for its target proteins, we used a coimmunoprecipitation assay to examine whether the association of Nrf2 with  $\beta$ -TrCP is dependent on phosphorylation (Fig. 8B). GSK-3 activity was modulated in Keap1-null MEFs through indirect activation of this kinase by serum starvation for 6 h or by the use of LY294002 (10  $\mu$ M, 2 h) and direct inhibition with the inhibitor CT99021 (5  $\mu$ M, 2 h). LY294002 inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt axis, which in these cells is a negative regulator of GSK-3, and therefore produces an increase in GSK-3 activity (data not shown). Nrf2-null MEFs were used as a control. As expected, basal Nrf2 levels were modified by these treatments, with slightly higher levels in CT99021-treated cells and lower levels in LY294002-treated and serum-starved cells. In pulldown experiments, equal immunoprecipitation of Nrf2 was achieved by using a limiting amount of Nrf2 antibody. Interestingly, when Nrf2 was immunoprecipitated under these conditions, we observed co-IP of  $\beta$ -TrCP in complexes from serum-starved and LY294002-treated cells, but less  $\beta$ -TrCP was observed in complexes from CT99021-treated cells. Conversely, when  $\beta$ -TrCP was immunoprecipitated, the amount of Nrf2 recovered in the complex was much larger under conditions of GSK-3 activation by either serum starvation or LY294002 treatment than under conditions where GSK-3 was inhibited with CT99021. These results indicate that association of Nrf2 and  $\beta$ -TrCP is enhanced by GSK-3-mediated phosphorylation.

Further evidence for the role of the Ser cluster of the Neh6 degon in interaction with  $\beta$ -TrCP was obtained in HEK293T cells cotransfected with expression vectors for Flag-tagged  $\beta$ -TrCP and either Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup> or Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup>, together with either HA-GSK-3 $\beta^{Y216F}$  or HA-GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$  (Fig. 8C). After 24 h of recovery from transfection, cellular lysates were immunoprecipitated with anti-V5 or anti-Flag antibodies. Immunoprecipitation with both antibodies revealed that an association was observed between  $\beta$ -TrCP and Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup> but not between  $\beta$ -TrCP and Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup>. Furthermore, when HA-GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$  was overexpressed, we could detect larger amounts of Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup> bound to  $\beta$ -TrCP but not larger amounts of Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup> bound to  $\beta$ -TrCP. These data correlate well with the results presented in Fig. 8A, and together they show that the lower ubiquitination of the 6S mutant is compatible with an inability to interact with  $\beta$ -TrCP.

As shown in Fig. 8D, the lack of association between  $\beta$ -TrCP and Nrf2 was accompanied by a failure of SCF/ $\beta$ -TrCP to regulate the transcription factor. HEK293T cells were cotransfected with expression vectors encoding either Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup> or Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup> and a dominant-negative  $\beta$ -TrCP <sup>$\Delta$ Fbox</sup>-HA mutant. Consistent with our previous findings (Fig. 4D), this dominant-negative version of the SCF/ $\beta$ -TrCP complex increased the level of the Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup> protein. In contrast, the basal level of the Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE 6S/6A-V5</sup> protein was higher than that of Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE-V5</sup>, but it was insensitive to further accumulation when coexpressed with  $\beta$ -TrCP <sup>$\Delta$ Fbox</sup>-HA. These findings suggest that the 6-Ser cluster within the Neh6 domain of Nrf2 is required in order to allow SCF/ $\beta$ -TrCP to negatively control the stability of Nrf2.

## DISCUSSION

Since Nrf2 participates in multiple aspects of cell physiology, it is essential that its activity is stringently controlled. Herein, we have uncovered a novel pathway for Nrf2 degradation that is controlled by GSK-3 and the SCF/ $\beta$ -TrCP E3 ubiquitin ligase.

Some transcription factors, including Snail and  $\beta$ -catenin, are subject to dual regulation by GSK-3 $\beta$  in that the kinase controls both their subcellular location and their degradation. Thus, GSK-3 $\beta$  phosphorylates both Snail and  $\beta$ -catenin at 6-Ser clusters, thereby modulating their subcellular distribution and their  $\beta$ -TrCP-mediated ubiquitination (54). We speculated that Nrf2 might be similarly negatively regulated by GSK-3 and  $\beta$ -TrCP. In the present article, we have focused on the regulation of Nrf2 stability by GSK3/ $\beta$ -TrCP because Salazar et al. (39) have already described the nuclear exclusion of Nrf2 following its modification by GSK-3. Now we report that a potent and selective inhibitor of GSK-3, SB216367 (arylindolemaleimide; IC<sub>50</sub>, 34 nM) (also data not shown with CT99021, aminopyrimidine; IC<sub>50</sub>, 10 nM [30]), and siRNAs against GSK-3 isoforms produce an increase in the level of the Nrf2 protein. Stabilization of Nrf2 following GSK-3 inhibition occurred in Keap1-deficient MEFs and in an ectopically expressed Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup> mutant that is insensitive to repression by Keap1. Therefore, regulation of Nrf2 protein stability by GSK-3 represents a previously unrecognized mechanism that is independent of the canonical Keap1 degradation pathway.

Within its Neh6 domain, Nrf2 contains a conserved region that conforms to the consensus motif recognized by  $\beta$ -TrCP. Thus, Neh6 contains a typical DSG motif followed by an isoleucine and a phosphorylatable Ser residue. This DSGIS sequence is identical to that found in the erythropoietin receptor (31) and the Yes-associated protein (52). Interestingly, using a completely different approach, McMahon et al. (29) reported a Keap1-independent degon in the same region of Nrf2 that  $\beta$ -TrCP recognizes and postulated that it limited the stability of the transcription factor during redox stress, when the E3 ubiquitin ligase substrate adaptor activity of Keap1 is inhibited. The region in mouse Nrf2 that was identified as a redox-independent degon by McMahon and colleagues was narrowed down to residues 329 to 339, but this was not reported to be a  $\beta$ -TrCP binding site, nor was it appreciated that it could be phosphorylated by GSK-3. We now propose that this redox-independent degon in the Neh6 domain also contains a cluster of Ser residues (in mouse Nrf2 these are Ser335, Ser338, Ser342, Ser347, Ser351, and Ser355) that are phosphorylated by GSK-3, probably in concert with other kinases.

GSK-3 provides a complex mode of regulation by protein phosphorylation, and presumably this applies to the phosphorylation of Nrf2. For the purpose of this discussion, we will exemplify GSK-3 $\alpha$  and - $\beta$  regulation of Nrf2 with the Ser/Thr protein kinase Akt. In cells exposed to growth and trophic factors, it is expected that GSK-3 $\alpha$  and - $\beta$  will be inactivated by Akt-mediated phosphorylation at Ser21 and Ser9, respectively. On the other hand, during prolonged oxidative stress when Akt is downregulated (for instance, by ceramide-activated phosphatase) (27, 40), it is likely that GSK-3 activity will increase. Moreover, the mechanism of action is also unusual in that GSK-3 shows a preference for substrates that have been phos-

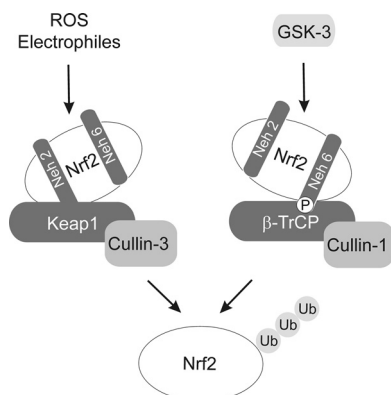


FIG. 9. Scheme showing the main participants in the “dual degradation” model. See Discussion for details.

phorylated previously by other kinases. Experiments under way will identify the residues in Nrf2 phosphorylated by GSK-3 and other cooperating kinases that cause activation of the Neh6 phosphodegron. Nevertheless, we can conclude from the data presented herein that phosphorylation of the Neh6 degon by GSK-3 generates a structural motif that is recognized by the  $\beta$ -TrCP E3 ligase.

Therefore, at least two mechanisms have evolved to control ubiquitin-proteasome-dependent degradation of Nrf2: the first, based on redox-dependent interactions between the Neh2 domain of Nrf2 and Keap1, leads to ubiquitination via the Keap1-Cul3/Rbx1 E3 ligase complex; the second, based on phosphorylation of the Neh6 domain of Nrf2, leads to ubiquitination via a  $\beta$ -TrCP/Cul1 E3 ligase complex. Both regulatory mechanisms must act in concert, and they may reflect differential regulation of Nrf2 under distinct physiological circumstances. In Fig. 9, we propose a “dual degradation” model that allows cross talk between both pathways under several physiological and pathological conditions, as follows.

(i) In a normal redox environment with typical growth and trophic support, a minimal amount of Nrf2 activity is required to maintain basal expression of some ARE-driven genes. Under these circumstances, the thiol groups of the redox-sensitive Cys residues in Keap1 are unmodified because electrophiles and prooxidants are present at low levels, and GSK-3 $\alpha$  and - $\beta$  should be inhibited by phosphorylation at Ser21 and Ser9, respectively, by active kinases such as Akt. Hence, under these conditions Nrf2 degradation occurs mainly via Keap1-Cul3/Rbx1 complexes.

(ii) Under the circumstances of strong oxidant or electrophilic injury with typical growth and trophic support, both GSK-3 and Nrf2 are subject to a temporal biphasic regulation. In the initial phase, oxidative stress leads to inhibition of several phosphatases, resulting in activation of Akt and further phosphorylation of GSK-3, causing inactivation of the kinase (27). At the same time, modification of thiols in Keap1 will lead to its inactivation and to stabilization of Nrf2, which will result in the induction of ARE-driven genes. In the late phase, Akt will be inhibited by ceramide-activated phosphatases or other mechanisms, and GSK-3 will become activated. Following its activation, GSK-3 will

target Nrf2 for  $\beta$ -TrCP-mediated proteasomal degradation. Thus, we predict that under these conditions, GSK-3 and  $\beta$ -TrCP should provide the predominant mechanism by which Nrf2 is ubiquitinated and directed to the 26S proteasome for degradation. This biphasic model has a relevant corollary on cell fate: if GSK-3 is activated before Nrf2 restores redox homeostasis, cells should die as a result of oxidative stress.

(iii) Under conditions of modest redox perturbation and deprivation of growth or trophic support or signaling, leading to GSK-3 activation, the thiol groups in Keap1 will not be modified to a substantial degree, and it should target Nrf2 for degradation in a relatively efficient manner. At the same time, activation of GSK-3 will also target Nrf2 for degradation through the  $\beta$ -TrCP pathway. The suppression of Nrf2 activity to below normal levels will lead to a further diminution in the basal expression of antioxidant and detoxification genes, thereby sensitizing cells to oxidative stress. Under such circumstances, the ensuing accumulation of ROS will oxidize critical Cys residues in Keap1, leading to a loss of its substrate adaptor activity, which allows Nrf2 to escape Cul3/Rbx1-directed degradation and in turn enables redox homeostasis to be restored. In this scenario, Keap1 cycles between the reduced and oxidized state, and it compensates the redox fluctuations that result from Nrf2 being targeted for degradation by  $\beta$ -TrCP.

The above “dual degradation” model has implications in pathology and the design of new therapeutic strategies. For instance, low Keap1 activity has been reported in tumors of lung, gallbladder, breast, and head and neck origins (reviewed in reference 12), suggesting that increases in Nrf2 may, in certain circumstances, contribute to the development of neoplastic disease. We speculate that drugs that activate GSK-3, such as Akt inhibitors, might be of therapeutic value because they may decrease Nrf2 levels through stimulating  $\beta$ -TrCP-mediated degradation. In neurodegenerative pathologies, including Alzheimer’s and Parkinson’s diseases, or even during the normal aging process, where exacerbated GSK-3 $\beta$  activity has been reported, we speculate that  $\beta$ -TrCP-mediated degradation of Nrf2 may be responsible for oxidative stress that accompanies these conditions. In such instances, chemopreventive agents might block Keap1 activity and lead to increases in Nrf2 levels that could correct perturbations in redox homeostasis. Indeed, it has been reported that lipoic acid restores the decline in glutathione levels and Nrf2 transcriptional activity that occurs with aging (43). Similarly, SFN is neuroprotective in a model of Parkinsonism in mice exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (A. Jazwa, A. I. Rojo, N. G. Innamorato, and A. Cuadrado, unpublished results). Moreover, under these pathological conditions GSK-3 $\beta$  inhibitors should also cooperate to increase Nrf2 levels.

In conclusion, the results presented here have revealed a Keap1-independent mechanism by which the stability of Nrf2 is controlled through GSK-3/ $\beta$ -TrCP. This newly identified mechanism must act in concert with the canonical Keap1 pathway. While the “dual degradation” model presented here is still speculative, it provides the basis to assess the contribution of each degon pathway in different physiological and pathological scenarios and to evaluate their potential use in therapy.



## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants SAF2007-62646 and SAF2010-17822 from the Spanish Ministry of Science and Innovation (awarded to A.C.), by grants C4909/A5942 and C4909/A9990 from Cancer Research UK (awarded to J.D.H.), and by a grant from Tenovus Scotland (awarded to M.M. and J.D.H.). P.R. is a recipient of a Formación de Profesorado Universitario fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

We thank Ronald T. Hay, Calum Sutherland, and Lindsay A. Allan for valuable discussions.

## REFERENCES

- Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler. 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**:3797–3804.
- Apopa, P. L., X. He, and Q. Ma. 2008. Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **22**:63–76.
- Calkins, M. J., et al. 2009. The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. *Antioxid. Redox Signal.* **11**:497–508.
- Cuadrado, A., P. Moreno-Murciano, and J. Pedraza-Chaverri. 2009. The transcription factor Nrf2 as a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **13**:319–329.
- Cullinan, S. B., J. D. Gordan, J. Jin, J. W. Harper, and J. A. Diehl. 2004. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol. Cell. Biol.* **24**:8477–8486.
- Cullinan, S. B., et al. 2003. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.* **23**:7198–7209.
- Ding, Q., et al. 2007. Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol. Cell. Biol.* **27**:4006–4017.
- Dinkova-Kostova, A. T., et al. 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:11908–11913.
- Feldman, R. M., C. C. Correll, K. B. Kaplan, and R. J. Deshaies. 1997. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**:221–230.
- Furukawa, M., and Y. Xiong. 2005. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol. Cell. Biol.* **25**:162–171.
- Hayakawa, M., H. Kitagawa, K. Miyazawa, M. Kitagawa, and K. Kikugawa. 2005. The FWD1/beta-TrCP-mediated degradation pathway establishes a 'turning off switch' of a Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, FGD1. *Genes Cells* **10**:241–251.
- Hayakawa, M., et al. 2008. Novel insights into FGD3, a putative GEF for Cdc42, that undergoes SCF(FWD1/beta-TrCP)-mediated proteasomal degradation analogous to that of its homologue FGD1 but regulates cell morphology and motility differently from FGD1. *Genes Cells* **13**:329–342.
- Hayes, J. D., and M. McMahon. 2009. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **34**:176–188.
- Homma, S., et al. 2009. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**:3423–3432.
- Huang, H. C., T. Nguyen, and C. B. Pickett. 2000. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:12475–12480.
- Innamorato, N. G., I. Lastres-Becker, and A. Cuadrado. 2009. Role of microglial redox balance in modulation of neuroinflammation. *Current Opin. Neurol.* **22**:308–314.
- Innamorato, N. G., et al. 2008. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J. Immunol.* **181**:680–689.
- Jain, A. K., and A. K. Jaiswal. 2006. Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J. Biol. Chem.* **281**:12132–12142.
- Kang, T., et al. 2008. GSK-3 beta targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3 beta inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer Cell* **13**:36–47.
- Kobayashi, A., et al. 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **24**:7130–7139.
- Kobayashi, M., and M. Yamamoto. 2006. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme Regul.* **46**:113–140.
- Lates, E., D. S. Chaur, and M. Pagano. 1999. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* **18**:849–854.
- Li, X., J. Liu, and T. Gao. 2009. Beta-TrCP-mediated ubiquitination and degradation of PHLPP1 are negatively regulated by Akt. *Mol. Cell. Biol.* **29**:6192–6205.
- Limon-Mortes, M. C., et al. 2008. UV-induced degradation of securin is mediated by SKP1-CUL1-beta TrCP E3 ubiquitin ligase. *J. Cell Sci.* **121**:1825–1831.
- Maher, J., and M. Yamamoto. 2010. The rise of antioxidant signaling—the evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **244**:4–15.
- Martin, D., et al. 2004. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J. Biol. Chem.* **279**:8919–8929.
- Martin, D., M. Salinas, N. Fujita, T. Tsuruo, and A. Cuadrado. 2002. Ceramide and reactive oxygen species generated by H2O2 induce caspase-3-independent degradation of Akt/protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **277**:42943–42952.
- McMahon, M., N. Thomas, K. Itoh, M. Yamamoto, and J. D. Hayes. 2006. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J. Biol. Chem.* **281**:24756–24768.
- McMahon, M., N. Thomas, K. Itoh, M. Yamamoto, and J. D. Hayes. 2004. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 domain and the redox-insensitive Neh6 domain. *J. Biol. Chem.* **279**:31556–31567.
- Meijer, L., M. Flajolet, and P. Greengard. 2004. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**:471–480.
- Meyer, L., et al. 2007. Beta-Trcp mediates ubiquitination and degradation of the erythropoietin receptor and controls cell proliferation. *Blood* **109**:5215–5222.
- Nioi, P., and T. Nguyen. 2007. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**:816–821.
- Pan, Y., C. B. Bai, A. L. Joyner, and B. Wang. 2006. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol. Cell. Biol.* **26**:3365–3377.
- Papkoff, J., and M. Aikawa. 1998. WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**:851–858.
- Petroski, M. D., and R. J. Deshaies. 2005. In vitro reconstitution of SCF substrate ubiquitination with purified proteins. *Methods Enzymol.* **398**:143–158.
- Pi, J., et al. 2007. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic. Biol. Med.* **42**:1797–1806.
- Rojo, A. I., et al. 2008. Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal cell death. *Mol. Cell Neurosci.* **39**:125–132.
- Rojo, A. I., M. R. Sagarra, and A. Cuadrado. 2008. GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J. Neurochem.* **105**:192–202.
- Salazar, M., A. I. Rojo, D. Velasco, R. M. de Sagarra, and A. Cuadrado. 2006. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* **281**:14841–14851.
- Salinas, M., R. Lopez-Valdaliso, D. Martin, A. Alvarez, and A. Cuadrado. 2000. Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol. Cell Neurosci.* **15**:156–169.
- Shibata, T., et al. 2008. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:13568–13573.
- Skowyra, D., K. L. Craig, M. Tyers, S. J. Elledge, and J. W. Harper. 1997. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**:209–219.
- Suh, J. H., et al. 2004. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:3381–3386.
- Sun, Z., Z. Huang, and D. D. Zhang. 2009. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One* **4**:e5888.
- Treier, M., L. M. Staszewski, and D. Bohmann. 1994. Ubiquitin-dependent C-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* **78**:787–798.
- Varghese, B., et al. 2008. Polyubiquitination of prolactin receptor stimulates its internalization, postinternalization sorting, and degradation via the lysosomal pathway. *Mol. Cell. Biol.* **28**:5275–5287.
- Wakabayashi, N., et al. 2004. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:2040–2045.
- Wang, B., and Y. Li. 2006. Evidence for the direct involvement of beta-TrCP in Gli3 protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:33–38.
- Yu, X., and T. Kensler. 2005. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutation Res.* **591**:93–102.
- Zhang, D. D., and M. Hannink. 2003. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of

- Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 8137–8151.
51. **Zhang, D. D., S. C. Lo, J. V. Cross, D. J. Templeton, and M. Hannink.** 2004. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.* **24**:10941–10953.
52. **Zhao, B., L. Li, K. Tumaneng, C. Y. Wang, and K. L. Guan.** 2010. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF( $\beta$ -TRCP). *Genes Dev.* **24**:72–85.
53. **Zhao, F., et al.** 2009. Nrf2 promotes neuronal cell differentiation. *Free Radic. Biol. Med.* **47**:867–879.
54. **Zhou, B. P., et al.** 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* **6**:931–940.
55. **Zhu, Z., and M. Kirschner.** 2002. Regulated proteolysis of Xom mediates dorsoventral pattern formation during early *Xenopus* development. *Dev. Cell* **3**:557–568.



## Original Contribution

# Signaling pathways activated by the phytochemical nordihydroguaiaretic acid contribute to a Keap1-independent regulation of Nrf2 stability: Role of glycogen synthase kinase-3

Ana I. Rojo <sup>a,b,1</sup>, Omar Noel Medina-Campos <sup>c,1</sup>, Patricia Rada <sup>a</sup>, Adverqueydi Zúñiga-Toalá <sup>c</sup>, Areli López-Gazcón <sup>c</sup>, Sandra Espada <sup>a</sup>, José Pedraza-Chaverri <sup>c,\*</sup>, Antonio Cuadrado <sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" UAM-CSIC, Centro de Investigación en Red Sobre Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto de Investigación Sanitaria la Paz, Madrid 28029, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 August 2011

Revised 3 November 2011

Accepted 4 November 2011

Available online 12 November 2011

## Keywords:

Nordihydroguaiaretic acid

Nrf2

HO-1

Cell signaling

Cytoprotection

Free radicals

## ABSTRACT

Defense against oxidative stress is executed by an antioxidant program that is tightly controlled by the transcription factor Nrf2. The stability of Nrf2 involves the interaction of two degradation domains, designated Neh2 and Neh6, with the E3 ubiquitin ligase adaptors, Keap1 and  $\beta$ -TrCP, respectively. The regulation of Nrf2 through the Neh6 degron remains largely unexplored but requires GSK-3 to form a phosphodegron. In this study, the cancer-chemopreventive agent nordihydroguaiaretic acid (NDGA) increased the level of Nrf2 protein and expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in kidney-derived LLC-PK1 and HEK293T cells and in wild-type mouse embryo fibroblasts (MEFs). However, NDGA did not induce HO-1 in Nrf2<sup>-/-</sup> MEFs, indicating that Nrf2 is required for induction. The relevance of the Nrf2/HO-1 axis to antioxidant protection was further demonstrated by the finding that the HO-1 inhibitor stannous-mesoporphyrin abolished protection against hydrogen peroxide conferred by NDGA. NDGA increased Nrf2 and HO-1 protein levels in Keap1<sup>-/-</sup> MEFs, implying that Keap1-independent mechanisms regulate Nrf2 stability. Mutants of the Neh2 or Nrh6 domain and chimeric proteins comprising cyan fluorescent protein fused to Neh2 and green fluorescent protein fused to Neh6 exhibited longer half-lives in the presence of NDGA, demonstrating that NDGA targets both the Neh2 and the Neh6 degrons. In common with other chemopreventive agents, NDGA activated the ERK1/2, p38, JNK, and PI3K pathways. By using selective kinase inhibitors we found that PI3K, JNK, and p38 were responsible for the stabilization of Nrf2 and induction of HO-1 by NDGA. To explain how NDGA might up-regulate Nrf2 in a Keap1-independent manner we explored the participation of GSK-3 $\beta$  because it controls the Neh6 phosphodegron. Importantly, NDGA caused inhibitory phosphorylation of GSK-3 $\beta$  at Ser9 and at Thr390, and this was associated with a substantial reduction in Neh6 phosphorylation. Our study demonstrates that NDGA activates Nrf2 through multiple signaling cascades and identifies GSK-3 $\beta$  as an integrator of these signaling pathways and a gatekeeper of Nrf2 stability at the level of the Neh6 phosphodegron.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Transcription factor Nrf2 is a cap'n'collar (CNC) basic-region leucine zipper (bZIP) protein that has emerged in recent years as a master regulator of cellular redox homeostasis [1]. It controls the expression of more than 100 genes that contain antioxidant response elements (AREs) in their promoter regulatory regions [2], including those encoding antioxidant proteins such as heme oxygenase-1 (HO-1) [3]. Collectively, these enzymes participate in scavenging reactive oxygen species (ROS) and maintaining redox homeostasis. It is becoming increasingly evident

that Nrf2 contributes to many physiological processes, including detoxification, biotransformation, inflammation, cytoprotection, proliferation, aging, etc., and that consequently its activity must be tightly controlled for optimal response to endogenous and exogenous agents.

Nrf2 is controlled primarily at the level of protein stability, because of the presence of at least two degradation domains (degrons) within its Neh2 and Neh6 domains [4,5]. The Neh2 domain (residues 1–90) contains a redox-sensitive degron that under unstressed conditions interacts with the redox sensor Keap1 to allow ubiquitination and subsequent degradation of Nrf2 [6–9]. The interaction between the Neh2 domain and Keap1 occurs via two motifs in the CNC-bZIP protein, a high-affinity ETGE motif and a low-affinity DLG motif, each interacting with a separate Kelch-repeat domain present in the

\* Corresponding author. Fax: +52 55 5622 3878.

\*\*Corresponding author.

E-mail addresses: [pedraza@unam.mx](mailto:pedraza@unam.mx) (J. Pedraza-Chaverri), [antonio.cuadrado@uam.es](mailto:antonio.cuadrado@uam.es) (A. Cuadrado).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

Keap1 homodimer [10,11]. In addition to its interaction with Nrf2, Keap1 also binds Cullin-3 (Cul3), which forms a core E3 ubiquitin ligase complex through an association with ring-box 1 protein (Rbx1, also called Roc1) [6–9]. The Keap1–Cul3–Rbx1 complex ubiquitinates Nrf2 and targets it for proteasomal degradation only under normal redox conditions. However, upon exposure to oxidants or electrophiles, at least Cys151, Cys273, and Cys288 in Keap1 become modified, leading to a disturbance in the interaction between Nrf2 and Keap1 [12–14]. Failure of Keap1 to dock properly to the Neh2 domain permits Nrf2 to escape ubiquitination by Cul3–Rbx1 [13–15]. Thus, stress-related modification of Keap1 results in Nrf2 stabilization, accumulation of the transcription factor in the nucleus, and up-regulation of ARE-driven genes. Regulation of Nrf2 stability through an interaction between its Neh2 domain and Keap1 seems to be the main redox-sensitive mechanism that accounts for cellular adaptation to oxidative stress [16].

The Neh6 domain (residues 300–378) contains a degron that includes a DSG motif embedded in a cluster of serine residues. This region is a docking site for the adaptor protein  $\beta$ -TrCP, which mediates the ubiquitination of Nrf2 by a Cullin1–Rbx1 complex [5]. Although very little is known about the regulation of Nrf2 by  $\beta$ -TrCP-dependent ubiquitination, evidence from other well-established  $\beta$ -TrCP substrates, such as Snail,  $\beta$ -catenin, Gli2 and Gli3, Xom, Cdc25a, FGD1 and FGD3, Mcl-1, securin, prolactin receptor, and the phosphatase PHLPP1 [17], suggests that the association between Nrf2 and  $\beta$ -TrCP is likely to be facilitated by phosphorylation of serine residues within and around the region in Nrf2 to which  $\beta$ -TrCP binds. Indeed, we have reported that, as for other  $\beta$ -TrCP substrates, the Neh6 degron is phosphorylated at least in part by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) [5]. Although the regulation of Nrf2 by Keap1 is now well established, very little is known about the regulation of Nrf2 by  $\beta$ -TrCP. Moreover, it is not known whether either endogenous signals or xenobiotics can antagonize the Neh6 degron.

Xenobiotic compounds that activate Nrf2 are diverse and share few common properties except for their ability to modify sulfhydryl groups of cysteines by oxidation or adduct formation. These classes include allyl sulfides, dithiolethiones, flavonoids, isothiocyanates, polyphenols, terpenoids, etc. [18,19]. Therefore much attention has been devoted to studying how these compounds alter the interaction between Keap1 and Neh2, which leads to Nrf2 stabilization [20]. On the other hand, numerous studies have consistently demonstrated that many xenobiotics, including chemopreventive agents, stimulate cell signaling cascades that participate in Nrf2 regulation. Although most compounds activate more than one kinase cascade they seem to show some preference. For instance, carnosol, *tert*-butylhydroquinone (tBHQ), triterpenoids, and statins may use mostly Akt signaling [21–25]; curcumin,  $\alpha$ -lipoic acid, quercetin, and hydroxychalcones may use stress-related MAP kinases p38, JNK, or ERK [23,25–27]; most compounds, including some of those mentioned above and resveratrol, brazilin, or epigallocatechin-3-gallate seem to require a combination of Akt and ERK [28–30], and kahweol requires both Akt and p38 [31].

Whereas stimulation of the above signaling pathways by xenobiotics has been thoroughly studied, little effort has been made to determine the cross talk among them or to identify a common downstream effector, such as GSK-3, that might integrate these pathways at the level of Nrf2. Therefore, it is still not clear how these compounds might signal to up-regulate Nrf2 aside from the Keap1 interaction. To address this question, in this study, we have analyzed the activation of Nrf2 and the cytoprotective response elicited by induction of HO-1 in response to the dicarboxylic nordihydroguaiaretic acid (NDGA). As will be shown in this study, NDGA targets a variety of signaling pathways that include PI3K/Akt and the MAP kinases ERK1/2, p38, and JNK. In addition, this compound has been reported to inhibit receptor tyrosine kinase signaling by growth factors such as IGF-1 [32] and it has been used as an inhibitor of lipoxygenase. Consequently, NDGA

provides a complex but integrative model to study how xenobiotics might activate various signaling pathways that converge at the up-regulation of Nrf2.

NDGA, more rigorously termed 4-[4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dimethylbutyl] benzene-1,2-diol, is a phenolic lignan containing two *o*-catechols at the ends of a short alkane chain (Supplementary Fig. 1A). It was originally isolated from *Larrea tridentata* and infusions from this plant have been used in popular medicine for multiple diseases [33]. NDGA is a bifunctional antioxidant, i.e., it has intrinsic ROS-scavenging activity and indirect antioxidant properties due to the induction of expression of antioxidant genes [34]. As an antioxidant molecule, NDGA is a potent *in vitro* scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion, and hypochlorous acid [35,36]. In addition to its intrinsic antioxidant nature, we have previously shown that NDGA induces the expression of the antioxidant enzyme HO-1 through Nrf2 in primary cultures of cerebellar granule neurons [37].

In this study, we have explored how various signaling pathways elicited by the model chemopreventive agent NDGA might lead to Nrf2 stabilization. Our findings indicate that NDGA targets both the Neh2 and the Neh6 degrons to increase Nrf2 stability and that multiple kinase cascades confer Nrf2 stability by preventing GSK-3-mediated degradation of Nrf2 through the Neh6 degron.

## Material and methods

### Cell culture and reagents

Porcine LLC-PK1 cells, human HEK293T cells, and mouse embryo fibroblasts (MEFs) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; high glucose concentration) supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.33% sodium bicarbonate, and antibiotics (100 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin) under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Keap1<sup>−/−</sup> and Keap1<sup>+/+</sup> MEFs were kindly provided by Dr. Ken Itoh (Center for Advanced Medical Research, Hirosaki University Graduate School of Medicine, Hirosaki, Japan). All tissue culture reagents were from GIBCO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). NDGA, bovine serum albumin (BSA), ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (Hepes), dithiothreitol (DTT), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Fluoromount aqueous mounting medium, poly-L-lysine, paraformaldehyde, Hoechst 33258, fluorescein diacetate (FDA), and protein kinase inhibitors LY294002, PD98059, SB203580, SP600125, and SB216763 were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dihydroethidium (DHE), 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA), and 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) were from Invitrogen. Stannous mesoporphyrin (SnMP) was from Frontier Scientific (Logan, UT, USA). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and isopropanol were from J.T. Baker (Mallinckrodt Baker S.A. de C.V., Xalostoc, Edo. de México, México). Biotinylated B nylon membranes were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Kinase inhibitors and NDGA were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO in cell culture was less than 0.2%.

### Plasmids

For luciferase assays we used an expression vector for *Renilla* (Promega, Madison, WI, USA) and ARE-Luc (a gift from Dr. J. Alam, Department of Molecular Genetics, Ochsner Clinic Foundation, New Orleans, LA, USA). Vector pCFP-Neh2 (2–101) was generated by PCR amplification using the following primers: forward, 5'-TAACAAGCTTTG-GATTGATTGACATC-3', and reverse, 5'-TAACAAGCTTCTACATACAGTCTTCAAA-3'. The pcDNA3.1/V5HisB-mNrf2 plasmid was used as template. HindIII sites in italic were used to introduce PCR products into pCFP-CI (Clontech). For vector pEGFP-Neh6 (306–483) the primers



used were forward, 5'-TAACCTCGAGGGACTATTGAAGGCTGT-3', and reverse, 5'-TAACGGATCCCTTAATTGAATTGCTCCTT-3', and the pcDNA3.1/V5HisB-mNrf2 plasmid was used as template. XhoI and BamHI sites in italic were used to introduce PCR products into pEGFP-CI (Clontech). All sequences were verified by automated sequencing. Plasmids pcDNA3.1/V5-mNrf2, pcDNA3.1/V5-mNrf2<sup>ΔETGE</sup>, pcDNA3.1/V5-mNrf2<sup>6S/6A</sup>, and pcDNA3.1/V5-mNrf2<sup>ΔETGE6S/6A</sup> have been described elsewhere [5].

### Antibodies

Nrf2 and lamin B1 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); HO-1 antibodies were from Assay Designs (Ann Arbor, MI, USA); Akt, SAPK/JNK, ERK1/2, p38, phospho-Akt (S473), phospho-SAPK/JNK, phospho-ERK1/2, and phospho-p38 antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); tubulin antibodies were from Sigma–Aldrich; actin antibodies were from Chemicon (Temecula, CA, USA) and Santa Cruz Biotechnology; goat anti-mouse and goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Assay Designs; and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

### Cell viability assessed by MTT reduction, FDA hydrolysis, and lactate dehydrogenase (LDH) activity

Cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) followed by the addition of MTT (0.125 mg/ml) and incubation for 1 h at 37 °C or by the addition of FDA (2 µg/ml) and incubation for 5 min at 37 °C. For MTT assay, the medium was discarded, formazan crystals were dissolved in isopropanol acid (0.1 N HCl in isopropanol), and the absorbance was measured at 570 nm. For FDA assay, fluorescence was read at excitation of 485 nm and emission of 520 nm. In the LDH assays, cell cytotoxicity was assessed by measuring the release of cytoplasmic LDH into cell culture supernatants. LDH activity was assayed using the Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics, USA) according to the manufacturer's instructions. Experiments were performed in triplicate. The LDH activity was quantified by measuring the wavelength absorbance at 490 nm. The percentage of cell cytotoxicity was calculated using the following formula:  $100 \times (\text{experimental LDH release}) / (\text{total LDH release})$ .

### HO activity

Pellets from LLC-PK1 cells were resuspended in 0.3 ml of 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, with 2 mM MgCl<sub>2</sub>, sonicated on ice for 10 s, incubated for 5 min on ice, and centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4 °C. The supernatants (175 µl) were incubated with a reaction mixture consisting of mouse liver cytosol, as a source of bilirubin reductase (25 µl); hemin (20 mM); glucose 6-phosphate (150 mM); glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.2 U/ml); and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (8 mM). The reaction was conducted at 37 °C in the dark for 1 h and terminated by the addition of 0.5 ml chloroform. The bilirubin formed was extracted by centrifugation at maximum speed for 45 s in a bench-top centrifuge and its content was calculated by the difference in absorbance between 464 and 530 nm ( $\epsilon = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Enzyme activity was expressed as pmol of bilirubin/mg of protein/h [38].

### ROS measurement

LLC-PK1 cells were seeded at density of  $7.5 \times 10^4$  cells per well on 48-well polystyrene plates. After treatments, cells were washed three times with PBS, loaded with 20 µM carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA and 20 µM DHE for 20 min, and washed three times with PBS and finally phenol red-free DMEM was added. Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA and DHE are nonfluorescent cell-permeative indicators with preference for several ROS and

O<sub>2</sub><sup>•−</sup>, respectively. In living cells carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA is oxidized to carboxydichlorofluorescein (carboxy-DCF) and emits bright green fluorescence, whereas DHE is dehydrogenated to ethidium and intercalates into DNA, staining the nucleus in bright fluorescent red. Fluorescence was observed in a Nikon Eclipse TS-100 F fluorescence microscope using excitation filters B2AC and G2A for carboxy-DCF and ethidium fluorescence, respectively. The images were acquired with a Nikon Digital Sight DS-Fi1 camera and the signals were quantified using Nis-Elements software version 3.0 (Nikon Instruments, USA).

### Cell fractionation

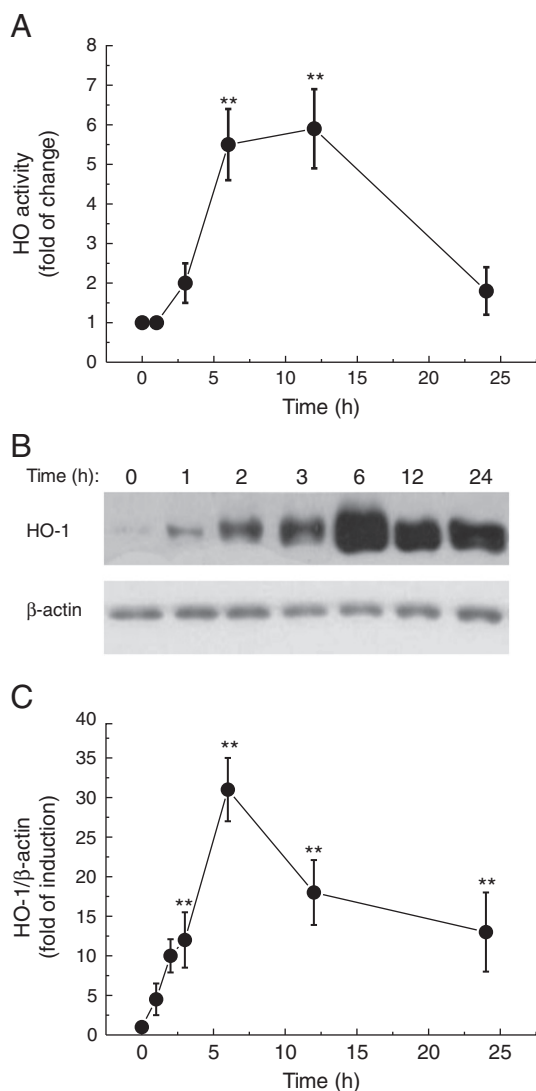
Cell pellets were resuspended in 5 volumes of hypotonic lysis buffer (10 mM Hepes (pH 8.0), 1 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1% Nonidet P-40 with protease inhibitors) and incubated for 15 min at 4 °C. The lysate was centrifuged at 5000 g for 1 min at 4 °C and the resulting supernatant was centrifuged at 25,000 g for 20 min at 4 °C. The supernatant (cytosolic fraction) was saved and the nuclear pellet was resuspended in 7 volumes of nuclear lysis buffer (20 mM Hepes (pH 7.5), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 20% glycerol, 420 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF with protease inhibitors), incubated for 30 min at 4 °C, and then centrifuged at 22,000 g for 5 min.

### Two-dimensional electrophoresis

For assays with λ-protein phosphatase, cells were lysed in 200 µl lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Then, the samples were sonicated and precleared by centrifugation, and 50 µl of the sample was incubated with λ-protein phosphatase (Upstate, Millipore) for 4 h at 37 °C. The samples were then precipitated using a 2D cleanup kit (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) and resuspended in 2D lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) Chaps, 30 mM Tris-HCl, pH 7.5). Parallel samples were lysed with 200 µl of the 2D lysis buffer and blots from control untreated cells exhibited similar distributions of spots in both lysis buffers. For 2D-gel electrophoresis, 50 µl of sample was dissolved in 300 µl of 2D rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) Chaps, 50 mM dithiothreitol, and 1% (v/v) IPG 4–7 buffer). Samples were loaded on immobilized pH gradient Immobiline DryStrip gels 4–7 (GE Healthcare) and isoelectrofocussed in an IPGphor3 basic unit (GE Healthcare) by applying a total of 55 kV/h (for each experiment, samples are processed in the same run of isoelectrofocalization). Then, the strips were first equilibrated for 10 min with 2% (w/v) DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 30% glycerol, 5% SDS, 0.05% bromophenol blue and then with 4% (w/v) iodoacetamide, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 30% glycerol, 5% SDS, and 0.05% bromophenol blue. The equilibrated strips were layered onto a 12% SDS-PAGE gel to perform the second-dimension separation. After blotting to Immobilon-P membranes, immunoblots were performed as described above, using anti-green fluorescent protein as primary antibody and peroxidase-conjugated anti-rabbit as second antibody. All of the 2D reagents mentioned above were supplied by PlusOne (GE Healthcare).

### Luciferase assays

Transient transfections of HEK293T cells were performed with the expression vectors for Renilla (Promega) and ARE-Luc as described previously [21]. Cells were seeded on 24-well plates (100,000 cells per well), cultured for 16 h, and transfected using calcium phosphate. After 24 h recovery from transfection, the cells were lysed and assayed for luciferase activity with the dual luciferase assay system (Promega), according to the manufacturer's instructions. Relative light units were measured in a GloMax 96 microplate luminometer with dual injectors (Promega).



**Fig. 1.** NDGA increases HO activity and protein levels. LLC-PK1 cells were subjected to 15  $\mu$ M NDGA for the indicated times. (A) HO enzyme activity. (B) HO-1 protein levels. (Top) Immunoblot with anti-HO-1 antibodies; (bottom) immunoblot with anti- $\beta$ -actin antibodies showing similar amounts of protein per lane. (C) Densitometric quantification of relative band intensities expressed as a ratio of HO-1/ $\beta$ -actin. Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 3$  or 4). \*\* $p < 0.01$  vs 0 h.

#### Immunoblotting

Cells were washed with cold PBS, pH 7.4, lysed in RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and complete protease inhibitor cocktail), and sonicated on ice for 10 s. Lysates were precleared by centrifugation and 25  $\mu$ g of protein was mixed with 2 $\times$  Laemmli buffer, boiled for 2 min, and resolved in SDS-polyacrylamide gels and transferred to Amersham Hybond ECL nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Blots were blocked with 5% nonfat milk in PBS, pH 7.4, with 0.1% Tween 20 for 1 h and incubated with primary antibodies, washed again with PBS-Tween, and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h to visualize labeled proteins by enhanced chemiluminescence.

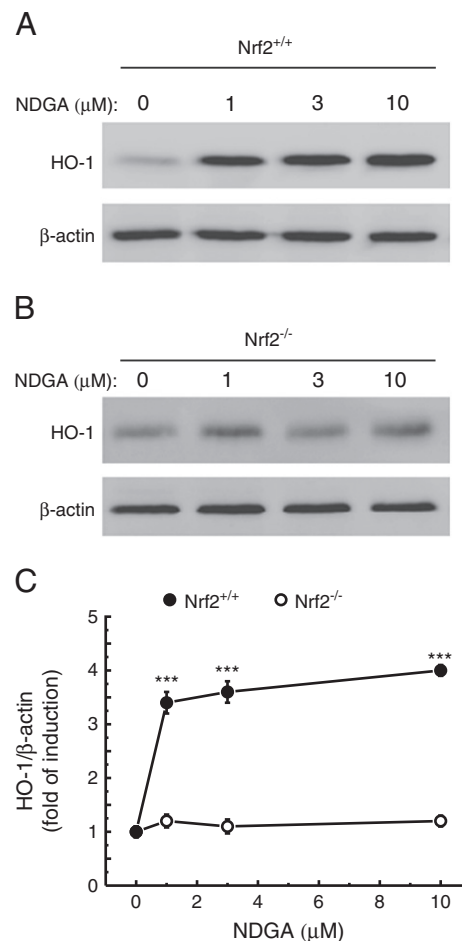
#### Immunofluorescence detection of Nrf2

The cells were seeded on 12-well plates containing sterile 18-mm glass coverslips treated with 0.025% poly-L-lysine and grown for 24 h. After exposure for 3 h to 15  $\mu$ M NDGA the cells were washed with

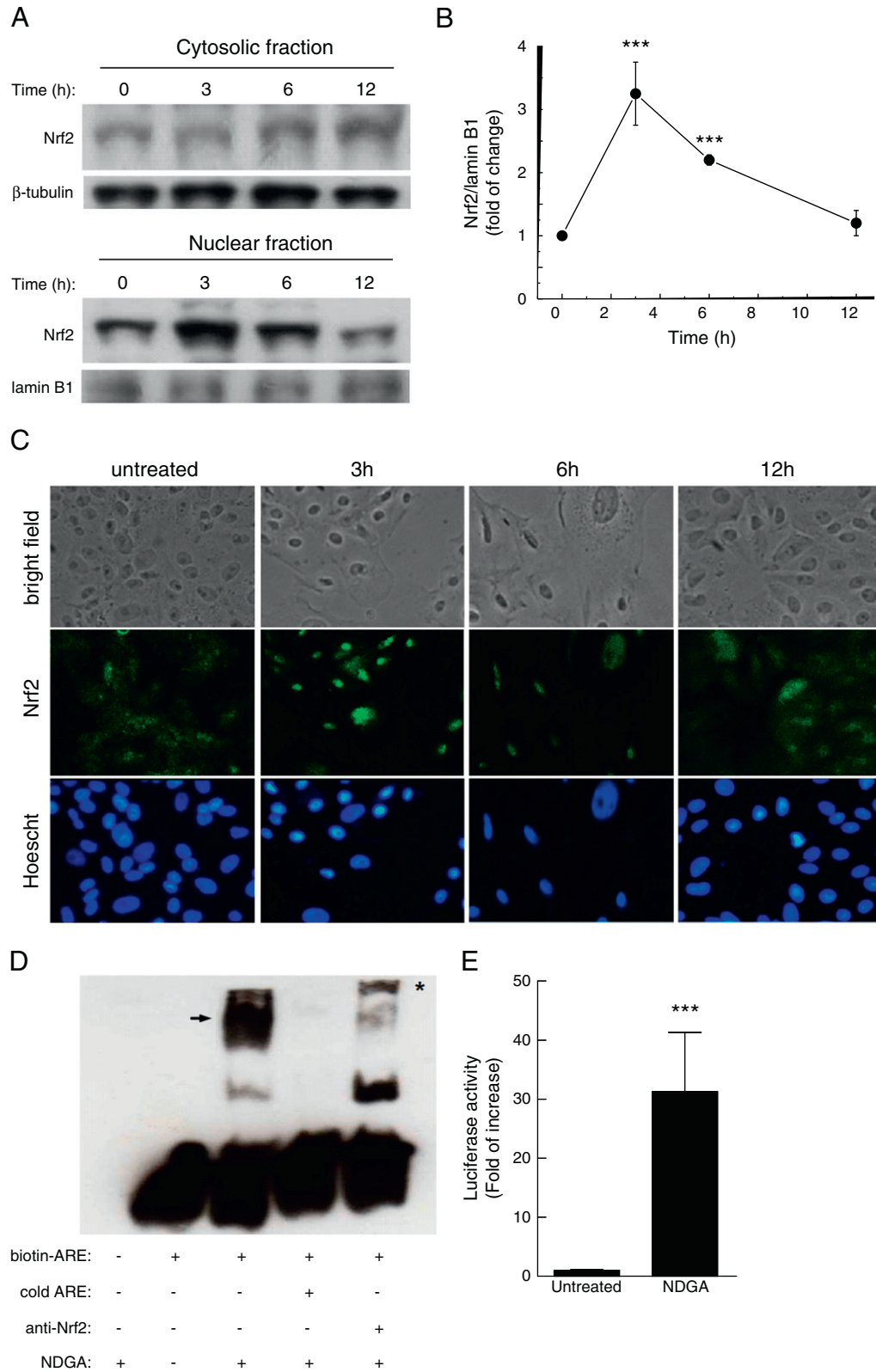
PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, permeabilized with 1% Triton X-100 for 20 min, blocked with 1% BSA–1% Triton X-100–0.3 M glycine, and incubated with anti-Nrf2 antibodies in 1% BSA–1% Triton X-100 for 2.5 h at room temperature. The coverslips were incubated overnight in the dark at 4  $^{\circ}$ C with FITC-conjugated secondary antibodies and washed with PBS. Nuclear counterstaining was performed with 0.0002% Hoechst 33258 for 1 min. The fluorescence was observed under a Nikon TS-100 F inverted fluorescence microscope using a B-2A/C filter for FITC and UV-2A filter for Hoechst. The images were acquired with a Nikon Digital Sight DS-Fi1 camera.

#### Electrophoretic mobility-shift assay (EMSA)

A biotinylated oligonucleotide probe containing the sequence 5'-GATCTTTTATGCTGAGTCATGGTTT-3' (core ARE in italic) manufactured by Accesolab S.A. de C.V. (Mexico City, DF, Mexico) was used as the probe. Ten micrograms of nuclear proteins was incubated with 20 fmol of labeled probe for 30 min and the binding reactions were carried out for 20 min according to the manufacturer's instructions. Binding reactions were allowed to proceed at room temperature for 20 min in 1 $\times$  binding buffer containing 0.05  $\mu$ g poly (dI-dC), 2.5% glycerol, 0.05% Nonidet P-40, 0.05 M KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM EDTA). An excess of competing unlabeled oligonucleotides was added 30 min before addition of the labeled probe. When supershift was used to identify proteins in the protein–DNA complexes, nuclear



**Fig. 2.** NDGA requires Nrf2 to induce HO-1 protein expression. (A and B) HO-1 protein levels in MEFs from Nrf2<sup>+/+</sup> and Nrf2<sup>-/-</sup> mice subjected to the indicated NDGA concentrations for 6 h. (Top) Immunoblots with anti-HO-1 antibodies. (Bottom) Immunoblots with anti- $\beta$ -actin antibodies, showing similar amounts of protein lysate per lane. (C) Densitometric quantification of (A) and (B). Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . \*\*\* $p < 0.001$  vs 0  $\mu$ M NDGA.



**Fig. 3.** NDGA activates the Nrf2 pathway. (A) NDGA-induced nuclear accumulation of Nrf2. Cells were incubated with 15  $\mu$ M NDGA for 3, 6, and 12 h. (Top) Immunoblots with anti-Nrf2 antibodies. (Bottom) Immunoblots with anti- $\beta$ -tubulin or lamin B1 antibodies, as indicated, showing similar loads of cytosolic and nuclear proteins, respectively. (B) Densitometric quantification of relative band intensities expressed as a ratio of Nrf2/lamin B1. \*\*\* $p$  < 0.001 vs 0 h. (C) Immunofluorescence staining of cells subjected to 15  $\mu$ M NDGA as indicated with anti-Nrf2 antibodies. Nuclear counterstaining was done with Hoechst 33258. Fluorescence was visualized using an inverted fluorescence microscope with 40 $\times$  objective. (D) NDGA enhances recruitment of Nrf2 to the ARE. Nuclear extracts of NDGA-treated cells were incubated with biotin-labeled ARE probe for 20 min at 25  $^{\circ}$ C. For supershift assay, the Nrf2 antibodies were added for another 30 min. The arrow indicates the shifted complexes and the asterisk indicates the supershifted complex. (E) NDGA activates the Nrf2-regulated antioxidant response element. Cells were transfected with a reporter plasmid carrying three tandem ARE sequences from the *Hmox1* promoter and a *Renilla* control plasmid and subjected for 16 h to 15  $\mu$ M NDGA. Values were normalized to *Renilla* activity and presented as fold of increase. Data are means  $\pm$  SEM,  $n$  = 4. \*\*\* $p$  < 0.001 vs untreated.

extracts were incubated with 1  $\mu$ g of Nrf2 antibodies for 30 min followed by the addition of labeled probe and a further incubation for 30 min. The reaction mixtures were resolved on 5% polyacrylamide gels in 1  $\times$  TBE buffer, blotted onto nylon membranes, and subjected to chemiluminescence detection.

#### Evaluation of mitochondrial membrane potential (MMP) by JC-1

MMP was assessed using the JC-1 cationic dye [39]. Cells were seeded into 48-well plates. After the indicated treatments the cells were washed with PBS and incubated for 25 min at 37 °C with culture medium without phenol red containing 2.5  $\mu$ g/ml JC-1. MMP depolarization was assessed by measuring the fluorescence intensity at an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelengths of 530 and 590 nm using a Synergy HT fluorescence microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA). The results were expressed as the ratio of JC-1 aggregate red fluorescence to monomer green fluorescence (F590/F530).

#### Statistical analyses

Results were expressed as means  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett or Bonferroni multiple comparisons test using

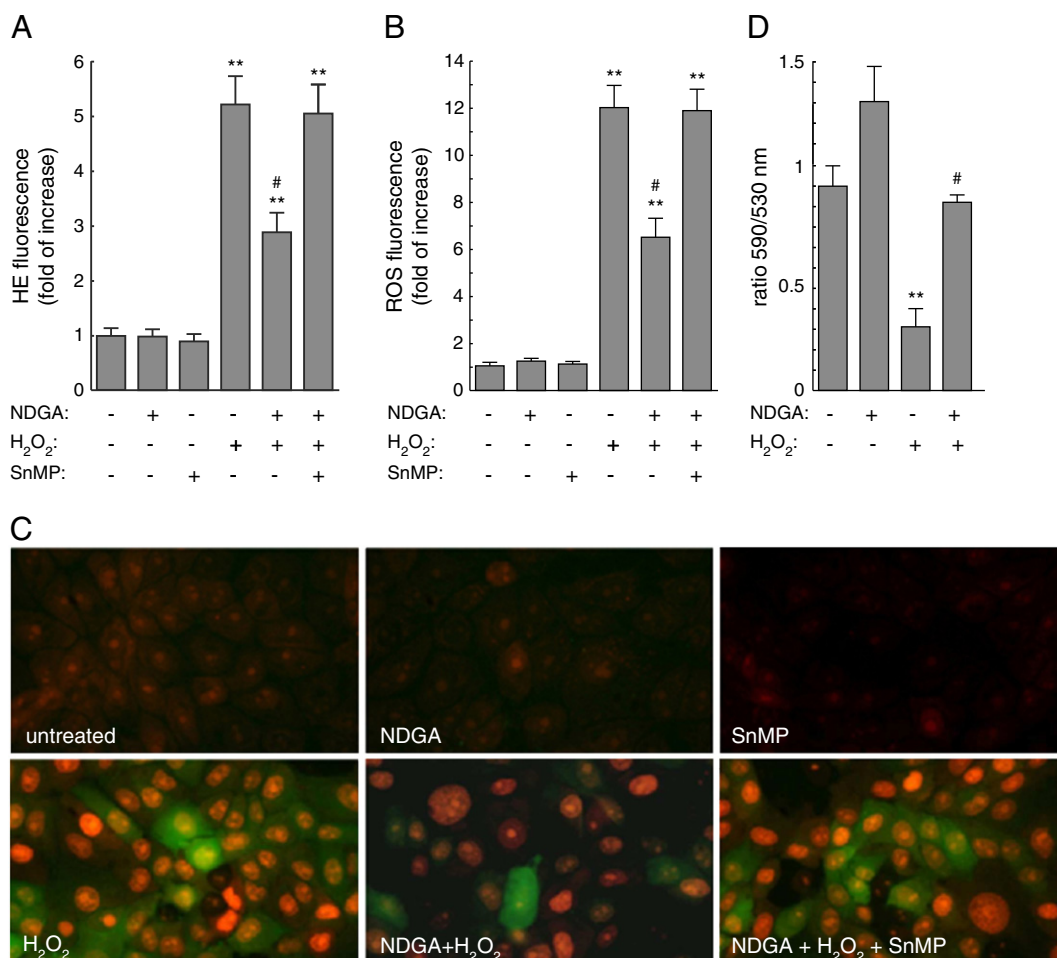
Prism version 5.03 software for Windows (GraphPad, San Diego, CA, USA). A  $p$  value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

#### NDGA increases HO-1 protein levels in an Nrf2-dependent manner

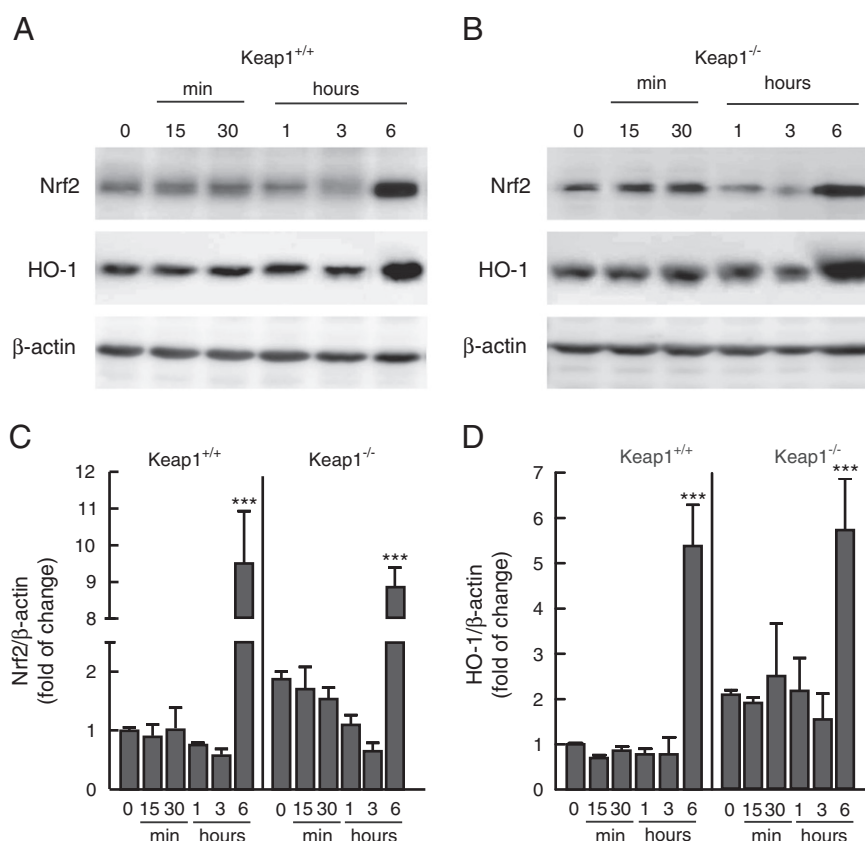
In preliminary experiments, we subjected the three cell lines used in this study, LLC-PK1, HEK293T, and MEFs, to a dose-response curve of NDGA. As shown in Supplementary Fig. 1B and C for LLC-PK1, NDGA induced a decrease in cell viability at concentrations above 20  $\mu$ M. Based on these data, a nontoxic concentration of 15  $\mu$ M was chosen for this study. LLC-PK1 cells were incubated with 15  $\mu$ M NDGA for 0, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 h. NDGA increased HO activity (Fig. 1A), reaching a maximum at 6 and 12 h ( $5.6 \pm 0.9$ - and  $5.9 \pm 1.1$ -fold, respectively). A similar time-course effect was observed for HO-1 protein levels determined by immunoblot (Fig. 1B and C), which were maximal at 6 h.

To determine the relevance of Nrf2 in the induction of HO-1 by NDGA, MEFs from Nrf2-knockout mice (Nrf2<sup>-/-</sup>) and wild-type littermates (Nrf2<sup>+/+</sup>) were incubated with 1, 3, and 10  $\mu$ M NDGA for 6 h and HO-1 protein levels were analyzed by immunoblot. A significantly increased expression of HO-1 was observed in MEFs from Nrf2<sup>+/+</sup> mice (Fig. 2A and



**Fig. 4.** NDGA requires HO activity to prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced intracellular ROS generation. Cells were preincubated with NDGA (15  $\mu$ M, 6 h) before treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM, 2 h). Where indicated SnMP (10  $\mu$ M, 30 min before NDGA addition) was used to inhibit HO activity. (A) Hydroethidine fluorescence, indicative of superoxide formation. (B) Carboxy-DCF fluorescence, indicative of ROS production. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . \*\* $p < 0.01$  vs untreated; # $p < 0.01$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vs NDGA + SnMP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (C) Representative pictures from cells treated as for (A) and (B) and incubated with hydroethidine (red fluorescence) and carboxy-DCF (green fluorescence). (D) NDGA prevents membrane mitochondrial depolarization induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cells were treated as for (A) and (B) and stained with JC-1 for 30 min. Graph shows the ratio 590/530 of the studied groups. Membrane mitochondrial depolarization was assessed by measuring red vs green fluorescence intensities as described under Material and methods. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 4$ . \*\* $p < 0.005$  vs untreated; # $p < 0.01$  vs 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.





**Fig. 5.** NDGA increases Nrf2 and HO-1 protein levels in MEFs from Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> mice with similar kinetics. Low-serum-starved MEFs were subjected to 15  $\mu$ M NDGA for the indicated times. (A and B) Immunoblots: (top) anti-Nrf2 antibodies, (middle) anti-HO-1 antibodies, and (bottom) anti- $\beta$ -actin antibodies showing similar protein loads per lane. (C and D) Densitometric analysis of Nrf2 and HO-1 protein levels from representative blots from (A) and (B), expressed as a ratio of Nrf2/ $\beta$ -actin or HO-1/ $\beta$ -actin. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs 0 time.

C) but not in MEFs from Nrf2<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2B and C), indicating that Nrf2 is essential for HO-1 induction.

#### NDGA increases Nrf2 protein levels and activates the ARE of Hmox1

NDGA induced a time-dependent accumulation of Nrf2 in the nucleus as determined by immunoblot of cytosolic and nuclear protein fractions (Fig. 3A and B) and by immunocytochemistry (Fig. 3C). Treatment with 15  $\mu$ M NDGA caused a maximum increase in Nrf2 nuclear levels at 3 h ( $3.3 \pm 0.4$ -fold) with a gradual decrease to baseline levels at 12 h ( $1.1 \pm 0.2$ -fold). These results were further analyzed in EMSAs using nuclear extracts from NDGA-treated cells and an Nrf2-binding oligonucleotide with the ARE sequence of the *Hmox1* gene, which encodes HO-1. As shown in Fig. 3D, NDGA induced the formation of a retarded complex. The intensity of this band complex was greatly reduced and supershifted in the presence of anti-Nrf2 antibodies further demonstrating the presence of Nrf2 in this complex. Finally, Nrf2 transcriptional activity was analyzed in a luciferase assay. HEK293T cells were cotransfected with a luciferase reporter construct carrying three tandem ARE sequences from *Hmox1* and a *Renilla* construct for normalization. As shown in Fig. 3E, NDGA (15  $\mu$ M, 16 h) led to a 30-fold increase in luciferase activity. Taken together these results indicate that, in response to NDGA, Nrf2 accumulates in the nucleus, binds the ARE sequence, and activates ARE-dependent gene expression.

#### NDGA uses the Nrf2/HO-1 axis to protect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death

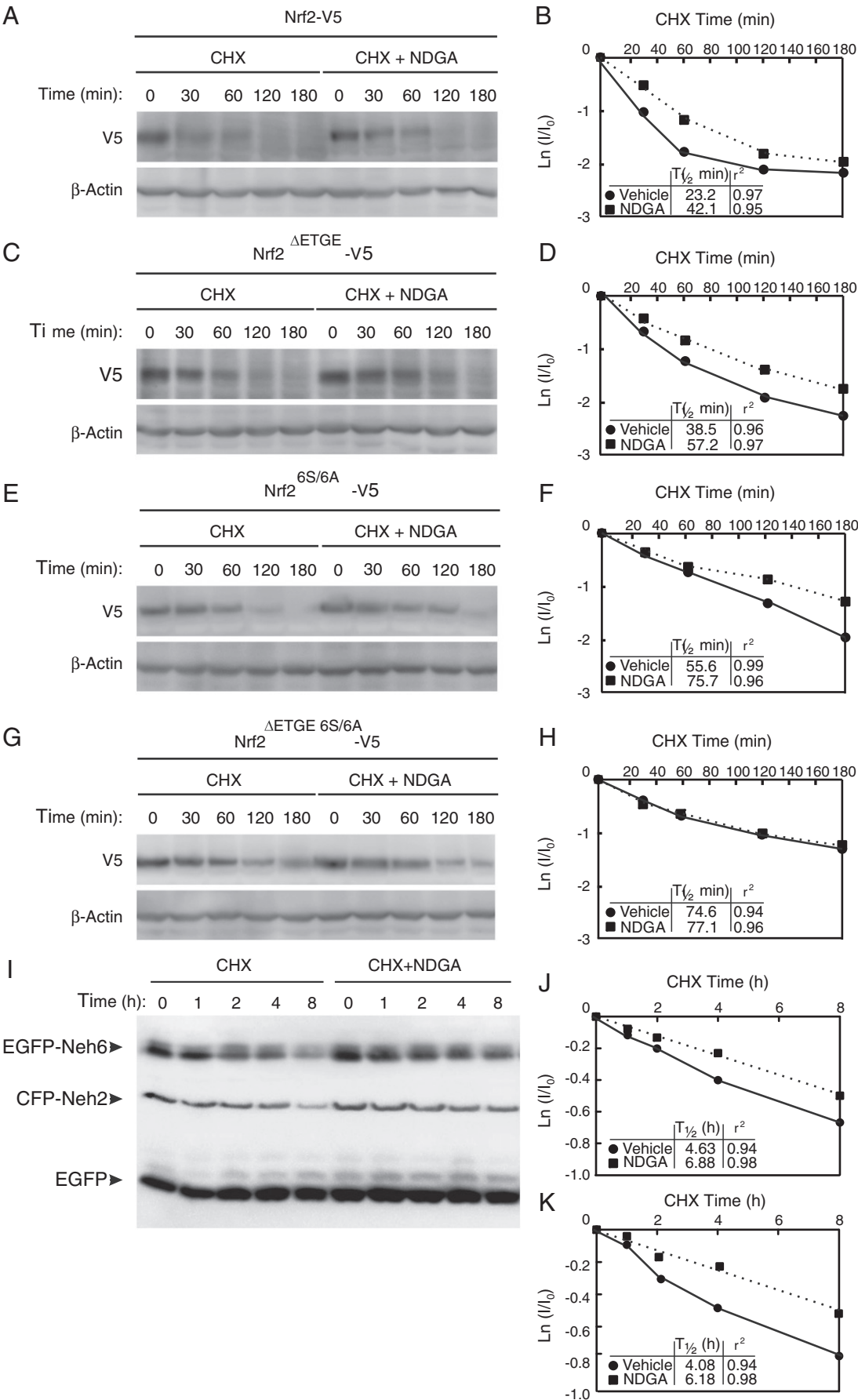
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced a dose-dependent loss of LLC-PK1 cell viability that was significant at 1 and 2 mM after 2 h exposure ( $54.1 \pm 6.2$  and  $27.7 \pm 1.1\%$ ,  $p < 0.001$  vs 0 mM; Supplementary Fig. 2). Therefore, to test the protective effect of NDGA against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure, cells

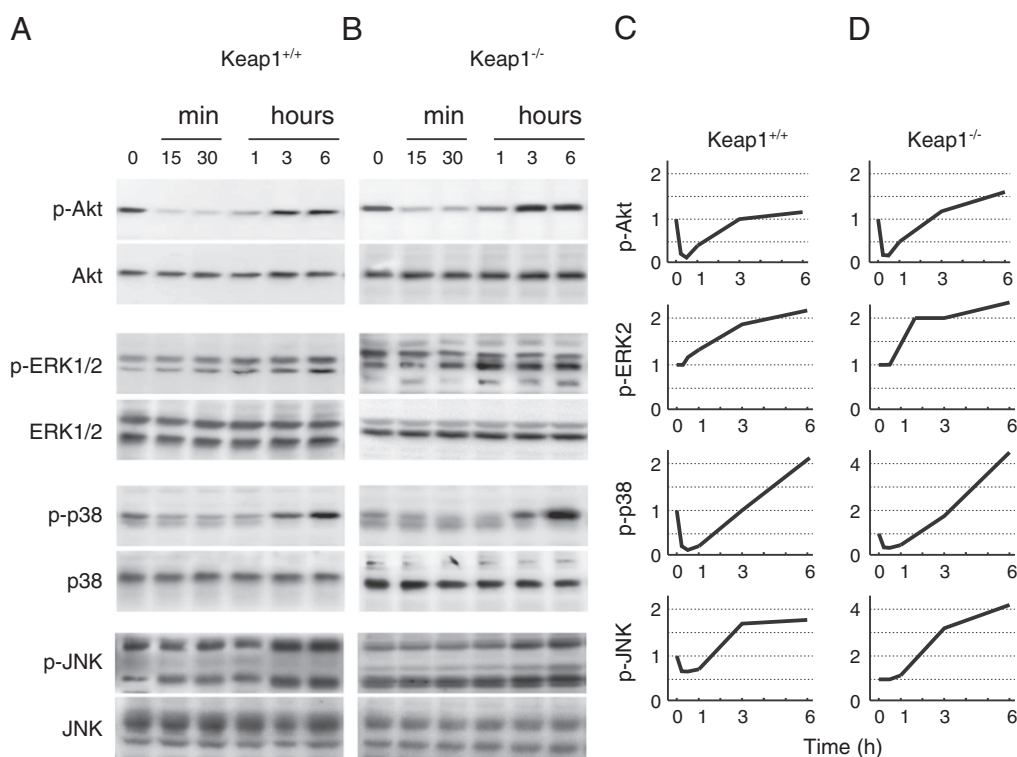
were pretreated with NDGA (15  $\mu$ M, 6 h) and then exposed to 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2 h. As shown in Supplementary Fig. 2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> caused a reduction in cell viability ( $49.1 \pm 4.6\%$ ) but NDGA pretreatment prevented the toxic effect of this oxidant molecule ( $87.2 \pm 5.3\%$ ,  $p < 0.01$ ). The HO inhibitor SnMP prevented the protective effect of NDGA ( $57.0 \pm 5.8\%$ ,  $p < 0.01$ ), suggesting the importance of HO-1 in the protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure.

To evaluate if the protective effect observed in pretreated cells with 15  $\mu$ M NDGA is associated with generation of ROS, fluorescence assays using dihydroethidium, carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA, and JC-1 dyes were performed (Fig. 4). Ethidium and carboxy-DCF fluorescence, indicative of superoxide and total ROS, were significantly higher in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells compared with control cells ( $5.2 \pm 0.5$ - and  $11.7 \pm 0.8$ -fold, respectively, Fig. 4A, B, and C). When cells were pretreated with NDGA (15  $\mu$ M, 6 h) the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced fluorescence of ethidium and carboxy-DCF was lower than that of control vehicle-treated cells ( $2.9 \pm 0.3$ - and  $6.4 \pm 0.7$ -fold, respectively). In addition, cells subjected to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incorporated lower levels of the cationic dye JC-1, indicative of a loss of mitochondrial membrane potential (Fig. 4D). However, NDGA prevented mitochondrial membrane depolarization. The protection afforded by NDGA against oxidative stress and mitochondrial depolarization was prevented at least partially by SnMP, therefore revealing an important protective role of HO-1.

#### NDGA increases Nrf2 and HO-1 protein levels in Keap1-deficient cells

To elucidate the mechanism by which NDGA targets Nrf2, we used MEFs from Keap1-null mice (Keap1<sup>-/-</sup>) and from wild-type littermates (Keap1<sup>+/+</sup>) (Fig. 5). Compared to the results obtained in LLC-PK1 kidney cells (Fig. 3), it was interesting that in both MEF types, NDGA had a biphasic effect, with a slight reduction in Nrf2 levels





**Fig. 7.** NDGA activates the MAPK and PI3K pathways. MEFs from Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> mice were grown for 16 h in low-serum medium and then stimulated with 15  $\mu$ M NDGA for the indicated times. (A and B) Whole-protein lysates were then immunoblotted with activation-specific antibodies that recognize phospho-Akt (Ser473) (p-Akt), phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2), phospho-p38 (p-p38), and phospho-JNK (p-JNK). Parallel immunoblots were analyzed for total kinase levels with anti-Akt, anti-ERK1/2, anti-p38, and anti-JNK antibodies, respectively. (C and D) Graphs corresponding to densitometric quantification of phospho-Akt, phospho-ERK1/2, phospho-JNK, and phospho-p38 levels relative to total kinase levels as indicated.

during the first 3 h followed by a very strong increase at 6 h. We attribute this difference in induction kinetics to the different embryonic origin and different set of receptor tyrosine kinases that might be targeted by NDGA (see Discussion). Nevertheless, the fact that NDGA increased Nrf2 levels in both MEFs suggests that NDGA uses, at least in part, a Keap1-independent mechanism to target Nrf2.

Next, we analyzed the effect of NDGA on the half-life of wild-type and Nrf2 mutants with disruption of Neh2, Neh6, or both degons. HEK293T cells were transfected with expression vectors for V5-tagged mouse Nrf2 (Nrf2-V5); Nrf2 mutant lacking four amino acids, ETGE, which are essential for Keap1 binding to the Neh2 domain (Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5); Nrf2 mutant Ser-to-Ala mutations at residues 335, 338, 342, 347, 351, and 355, which are required for GSK-3 phosphorylation and  $\beta$ -TrCP recognition of the Neh6 (Nrf2<sup>6S/6A</sup>-V5); and double-mutant Nrf2<sup>ΔETGE6S/6A</sup>-V5. After 16 h the cells were pulsed-chased with cycloheximide (CHX) (100  $\mu$ g/ml) in the presence of NDGA (15  $\mu$ M) for the indicated times. As shown in Fig. 6A–H, wild-type Nrf2-V5 exhibited a half-life of about 23 min and NDGA expanded it to about 42 min. Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5 and Nrf2<sup>6S/6A</sup>-V5 exhibited longer baseline half-lives of about 38 and 56 min, respectively, and both were increased by NDGA (57 and 76 min, respectively). By contrast, the double mutant Nrf2<sup>ΔETGE6S/6A</sup>-V5 exhibited the longest half-life (75 min) and the lowest protection by NDGA (77 min).

We constructed chimeric proteins made of cyan fluorescent protein (CFP) and enhanced green fluorescence protein (EGFP) fused to the Neh2 (CFP-Neh2) and Neh6 (EGFP-Neh6) degons, respectively. These constructs were used to analyze if the Neh2 and Neh6 domains destabilize these proteins and if we could modulate these domains

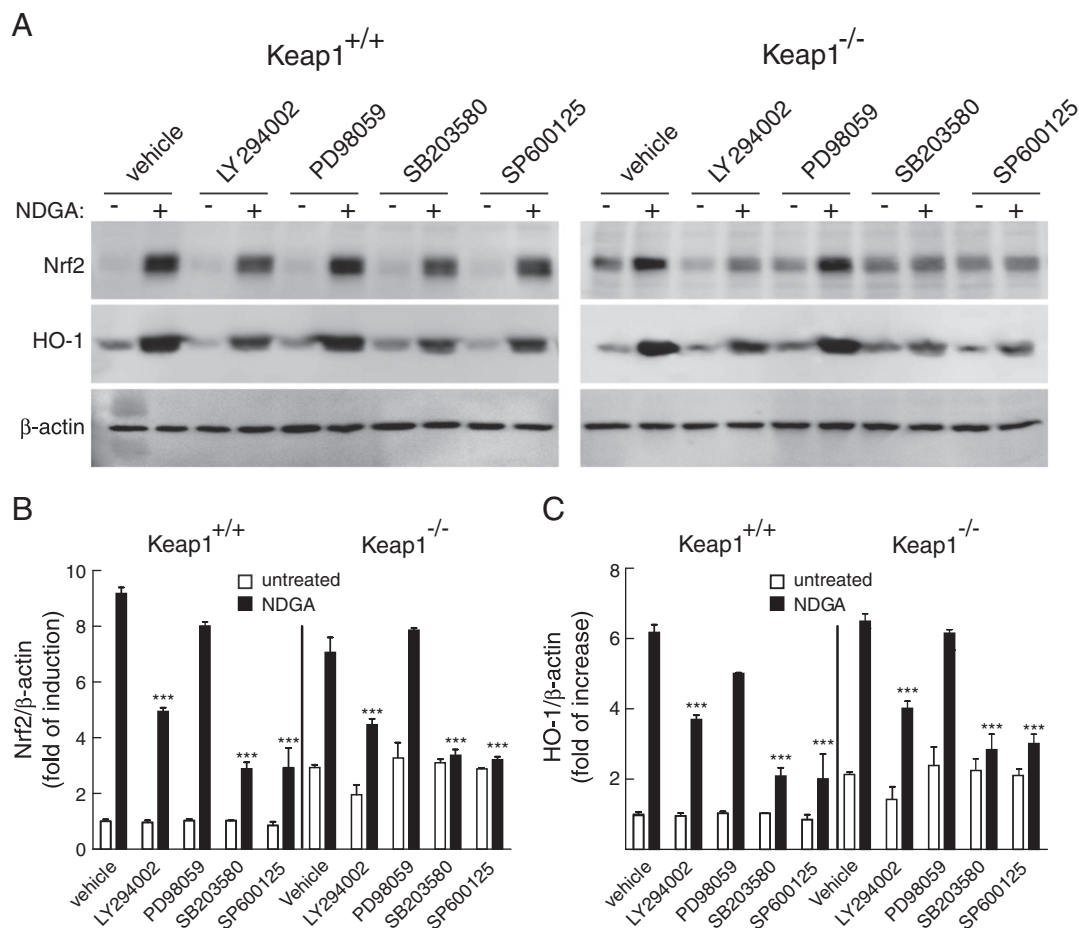
independently with NDGA (Fig. 6I, J, and K). HEK293T cells were cotransfected with expression vectors for CFP-Neh2, EGFP-Neh6, and EGFP as control. Then, the cells were pulsed-chased with CHX (100  $\mu$ g/ml) in the presence of NDGA (15  $\mu$ M) for the indicated times. As shown in Fig. 6I–K, whereas EGFP was stable for the entire length of the experiment, CFP-Neh2 and EGFP-Neh6 had shorter half-lives of about 4.63 and 4.08 h, respectively. However, in the presence of NDGA their turnover was slower, with half-lives of about 7 and 6 h, respectively. These results indicate that NDGA targets both Neh2 and Neh6 degons.

#### Signaling pathways activated by NDGA converge at the regulation of GSK-3 and the Neh6 degon

To get insight into how NDGA might be targeting the Neh6 degon, we first analyzed signaling pathways that might be induced by this compound in Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> MEFs. In the latter, the Neh2 degon is not functional because of the lack of Keap1. In both cell types NDGA exhibited similar induction kinetics for Nrf2, suggesting that Keap1 deficiency does not impair cell responsiveness to NDGA. Activation of Akt, ERK1/2, p38, and JNK was analyzed with phosphospecific antibodies that recognize the active state of these kinases (Fig. 7A and B). Two phases were observed in the signaling response to NDGA treatment. Thus, during the first hour of NDGA incubation we observed a reduction in activity of Akt and p38 in both cell types, whereas JNK and ERK1/2 remained at basal levels (Fig. 7C and D). After 3 and 6 h, all four signaling pathways were activated.

**Fig. 6.** NDGA increased Nrf2 stability by targeting both Neh2 and Neh6 domains. HEK293T cells were transfected with expression vectors for (A, B) Nrf2-V5, (C, D) Nrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5, (E, F) Nrf2<sup>6S/6A</sup>-V5, and (G, H) Nrf2<sup>ΔETGE6S/6A</sup>-V5 or (I, J, K) cotransfected with expression vectors for EGFP-Neh6, CFP-Neh2, and EGFP. Then the cells were low-serum-starved for 16 h and incubated with 100  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX) and 15  $\mu$ M NDGA. Whole-cell lysates were prepared at the indicated times after addition of CHX. (A, C, E, and G) (Top) Immunoblots incubated with anti-V5 antibody; (bottom) immunoblots with anti- $\beta$ -actin antibody. (I) Immunoblot incubated with anti-GFP antibody. Arrowheads point to the position of the three proteins of study. (B, D, F, H, J, and K) Graphs depict the natural logarithm of the relative protein levels of the indicated proteins as a function of CHX chase time. Protein half-life was determined using the linear part of the degradation curves.





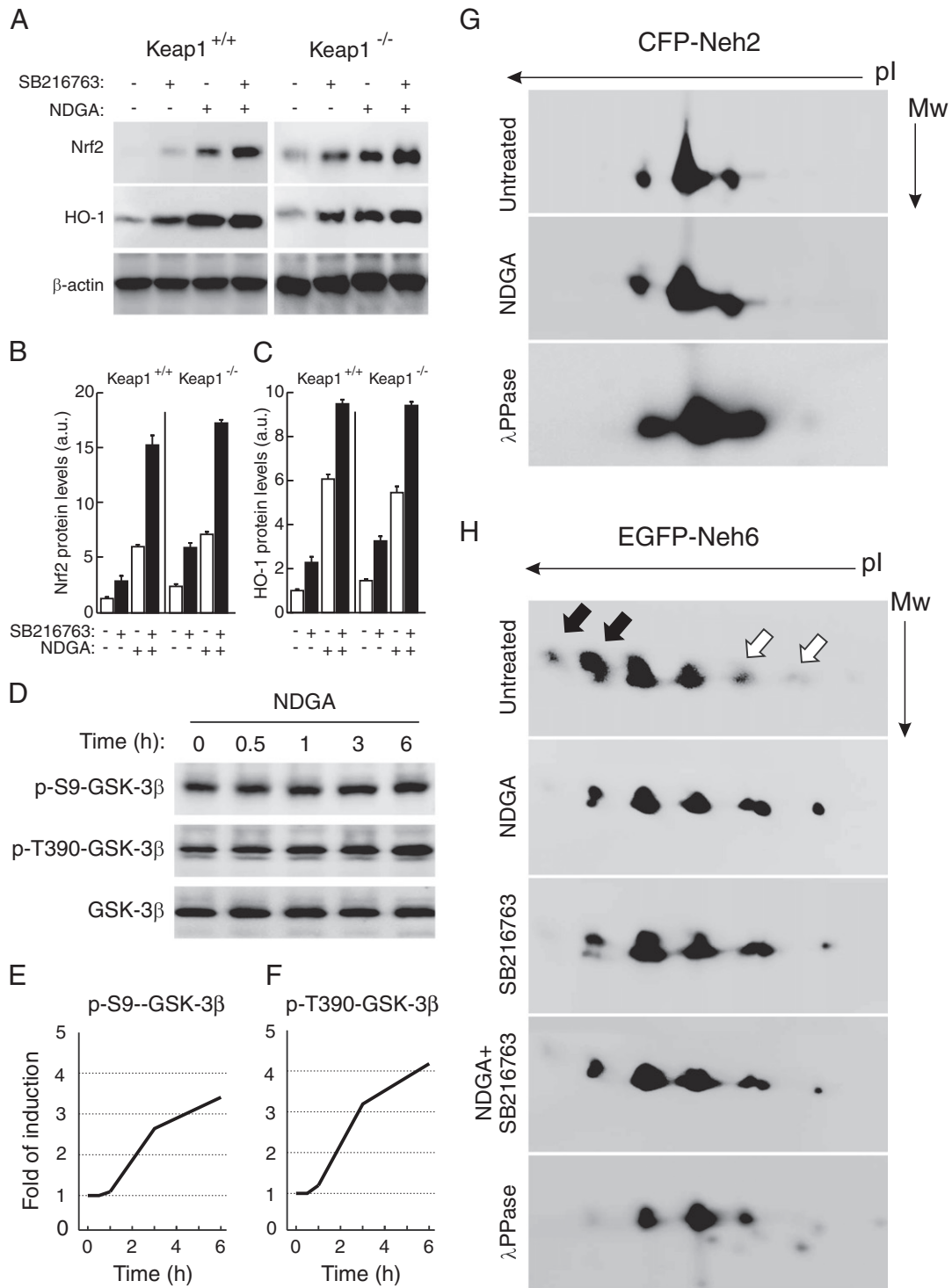
**Fig. 8.** Effects of MAPK and PI3K inhibitors on induction of Nrf2 and HO-1 protein by NDGA. MEFs from Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> mice were grown in low-serum medium for 16 h and then were preincubated with 40  $\mu$ M LY294002, 50  $\mu$ M PD98059, 5  $\mu$ M SB203580, or 10  $\mu$ M SP600125 for 15 min. Cells were subjected to 15  $\mu$ M NDGA for 6 h. (A) (Top) Immunoblot with anti-Nrf2 antibodies, (middle) immunoblot with anti-HO-1 antibodies, (bottom) immunoblot with anti- $\beta$ -actin antibodies showing similar amounts of protein per lane. (B) Densitometric quantification of Nrf2 protein levels from representative blots from (A) expressed as a ratio of Nrf2/ $\beta$ -actin. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . \*\*\* $p < 0.001$  vs NDGA control group. (C) Densitometric quantification of HO-1 protein levels from representative blots from (A) expressed as a ratio of HO-1/ $\beta$ -actin. Data are means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . \*\*\* $p < 0.001$  vs NDGA control group.

To determine which of these pathways might be responsible for Nrf2 induction, we pretreated both MEF types with selective inhibitors of each pathway for 15 min and then with NDGA for 6 h. Controls for specific inhibition of each pathway are shown in Supplementary Fig. 3. As shown in Fig. 8A, B, and C, in Keap1<sup>+/+</sup> MEFs inhibition of PI3K/Akt, p38, and JNK, but not ERK1/2, led to a reduction in Nrf2 protein levels. In Keap1<sup>-/-</sup> MEFs inhibition of these pathways rendered these cells unresponsive to NDGA, whereas ERK1/2 inhibition had no effect. These results indicate that in addition to the Keap1/Neh2-dependent regulation of Nrf2, at least three signaling pathways, namely PI3K, p38, and JNK, are also used by NDGA to stabilize Nrf2.

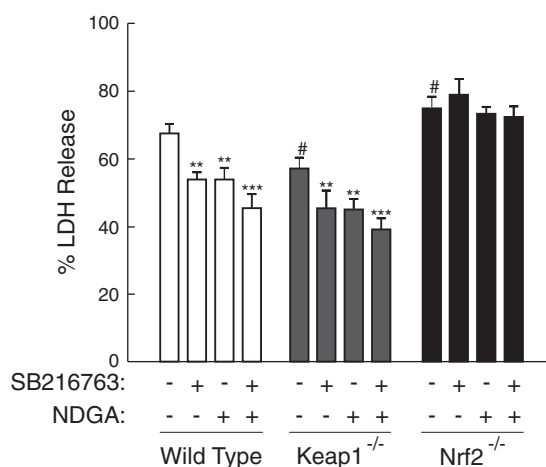
In a previous study, we reported that the Neh6 degon is regulated by GSK-3. Therefore we analyzed the implication of this kinase in the regulation of Nrf2 stability by NDGA. First, Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> MEFs were subjected to 15  $\mu$ M NDGA and the GSK-3 inhibitor SB216763 for 6 h (Fig. 9A, B, and C). In both MEF types NDGA and SB216763 increased Nrf2 and HO-1 protein levels, suggesting that NDGA targets GSK-3. Then, we focused on human HEK293T cells in which inhibition of GSK-3 $\beta$  activity can be monitored with antibodies against phospho-Ser9 and phospho-Thr390. These two residues are targeted by signaling pathways that are activated by either growth factors (PI3K/Akt, phospho-Ser9) or stress factors (p38/JNK, phospho-Thr390). As shown in Fig. 9D, E, and F, NDGA induced a time-dependent increase in inhibitory phosphorylation of both Ser9 and Thr390. These changes are consistent with a convergence of NDGA-induced signaling pathways at the level of GSK-3 $\beta$ .

We finally analyzed how NDGA affects the phosphorylation of the EGFP-Neh6 and CFP-Neh2 fusion proteins by two-dimensional gel electrophoresis. As shown in Fig. 9G and H, when cell lysates were preincubated with  $\lambda$ -phosphatase, both fusion chimeras presented a similar distribution of three spots, indicating the presence of post-translational modifications of the fluorescent protein that cannot be attributed to phosphorylation. As shown in Fig. 9G, Neh2 was not modified in any way by NDGA, therefore allowing two conclusions: that NDGA does not induce phosphorylation of the CFP domain and that NDGA does not activate a signaling pathway that leads to Neh2 phosphorylation. By contrast, EGFP-Neh6 exhibited a basal level of phosphorylation as evidenced by a more complex pattern of spots than that of  $\lambda$ -protein phosphatase-treated lysates (Fig. 9H). Interestingly, 4-h incubation with NDGA, SB216763, and both together led to a very similar pattern, with a reduction in hyperphosphorylated spots (Fig. 9H, filled arrows) and an increase in hypophosphorylated spots (empty arrows). These results indicate that NDGA reduces the phosphorylation of the Neh6 domain by targeting GSK-3 inhibition.

Considering that most studies have linked the effects of xenobiotics on Nrf2 activation with inhibition of Keap1, we asked whether the cell-protective effect of NDGA is Keap1 independent by comparing the response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in wild-type and Keap1<sup>-/-</sup> MEFs. These cells were grown in low serum for 16 h and then treated for 6 h with either NDGA (10  $\mu$ M) or SB216763 (10  $\mu$ M) or both drugs. After 4 h recovery without these compounds, the cells were challenged with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 16 h and analyzed for LDH release as an estimation of cell death



**Fig. 9.** NDGA targets GSK-3 and increases stability of Nrf2 through the Neh6 phosphodegron. (A) NDGA and the GSK-3 inhibitor SB216763 cooperate to increase Nrf2 and HO-1 protein levels in both Keap1<sup>+/+</sup> and Keap1<sup>-/-</sup> MEFs. Cells were grown in low serum for 16 h and then incubated with SB216763 or NDGA as indicated for 6 h, and whole-protein lysates were immunoblotted. (Top) Anti-Nrf2 antibodies, (middle) anti-HO-1 antibodies, (bottom) anti-β-actin antibodies. (B and C) Densitometric quantification of Nrf2 and HO-1 protein levels from representative blots from (A) expressed as a ratio of Nrf2/β-actin and HO-1/β-actin. Data are means ± SEM, *n* = 3. All groups *p* < 0.001 vs NDGA control group. (D) Time course of NDGA-induced phosphorylation of GSK-3β. HEK293T cells were grown in low-serum medium for 16 h and then were incubated with 15 μM NDGA for the indicated times. GSK-3β activity was monitored with antibodies against phospho-Ser9 (p-S9) and phospho-Thr390 (p-T390), which recognize phosphorylated inactive forms of this kinase. (E and F) Densitometric quantification of p-Ser9-GSK-3β and p-Thr390-GSK-3β from representative blots from (D) expressed as a ratio of pSer9-GSK-3β/GSK-3β and p-Thr390-GSK-3β/GSK-3β. (G and H) Bidimensional analysis of CFP-Neh2 and EGFP-Neh6 fusion chimeras. HEK293T cells were transfected with expression vectors for either chimera and grown under low-serum conditions for 16 h. Then, the cells were incubated with 15 μM NDGA or SB216763 for 4 h as indicated. Whole-protein lysates were resolved on 2D-gel electrophoresis and immunoblotted with anti-GFP antibodies. In the lower gels, the cell lysates were incubated with λ-phosphatase as a negative control for phosphorylation. (G) Analysis of CFP-Neh2 fusion chimera. (H) Analysis of EGFP-Neh6 fusion chimera. Filled arrows point to hyperphosphorylated spots that are greatly under-represented in NDGA- and SB216763-treated cells. Empty arrows point to hypophosphorylated spots that become overrepresented in NDGA- and SB216763-treated cells.

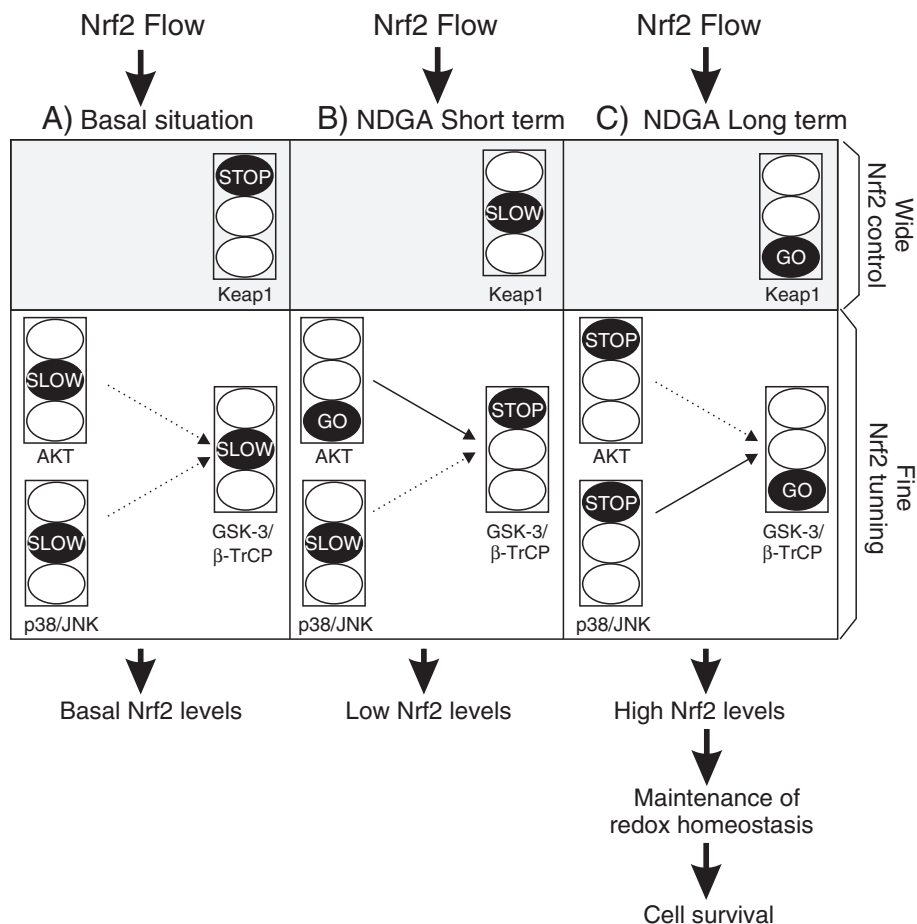


**Fig. 10.** NDGA protects against  $H_2O_2$ -induced cell death by Keap1-dependent and -independent mechanisms. Low-serum-starved wild-type, Keap1<sup>-/-</sup>, and Nrf2<sup>-/-</sup> MEFs were treated with 10  $\mu$ M SB216763, 10  $\mu$ M NDGA, or both compounds for 6 h. Then, the cells were allowed to recover in low serum without these compounds for 4 h and finally were subjected to 1 mM  $H_2O_2$  for 16 h. LDH activity was measured in the culture medium and in cell lysates. Values correspond to percentage of LDH activity released into the culture medium and correspond to means  $\pm$  SEM of three samples. # $p$  < 0.05 vs untreated wild-type cells, and \*\* $p$  < 0.01 or \*\*\* $p$  < 0.001 vs each untreated cell type.

(Fig. 10). Keap1<sup>-/-</sup> MEFs were more resistant to  $H_2O_2$ -induced cell death than wild-type MEFs. Moreover, NDGA and the GSK-3 inhibitor SB216763 were cytoprotective in both cell types and cooperated to further protect against  $H_2O_2$ . Off-target effects of NDGA and SB216763 were excluded by using MEFs from Nrf2<sup>-/-</sup> mice, in which neither NDGA nor SB216763 elicited a significant protection under the same experimental conditions. These results indicate that the cytoprotective effect of NDGA acting through Nrf2 depends not only on elimination of the Keap1 constrain but also on the elimination of GSK-3-mediated phosphorylation of this transcription factor.

## Discussion

Two lines of research have attempted to explain the molecular mechanisms involved in Nrf2 activation by endobiotic and xenobiotic compounds: one approach has focused on the inhibition of Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and the other has focused on the phosphorylation of Nrf2. Whereas the role of Keap1 in the regulation of Nrf2 has been studied in considerable detail and has provided an understanding of the cellular responses to electrophiles and oxidants, the regulation of Nrf2 by phosphorylation is poorly understood. Nrf2 is an acidic protein with 98 serine, threonine, and tyrosine residues (about 16% of the total amino acids) that might be phosphorylated



**Fig. 11.** Dual regulation of Nrf2 protein levels by Keap1 and GSK-3/β-TrCP. In this graph, Nrf2 protein levels are represented as Nrf2 flux to provide positive pressure toward transcriptional expression of phase 2 genes. (A) In resting cells (low-serum medium), Nrf2 flux is firmly blocked by Keap1-induced degradation (STOP traffic light). At the same time, signaling pathways are partially inhibited, meaning that GSK-3 is partially active, and therefore GSK-3/β-TrCP should only moderately contribute to reduce Nrf2 flux (SLOW traffic light). (B) During short-term NDGA treatment, Keap1 is inactivated and newly synthesized Nrf2 maintains a modest Keap1-independent Nrf2 flux; regarding signaling, NDGA, at least through receptor tyrosine kinase inhibition, represses Akt (Akt (S473)), resulting in GSK-3 activation. In such a scenario Nrf2 flux is mainly stopped by GSK-3/β-TrCP. (C) In longer term NDGA treatment, Keap1 remains inactivated (GO traffic light); signaling pathways restore Akt activity to basal levels but p38 and JNK exhibit a more robust activation leading to GSK-3 inhibition (phospho-Thr390). In this model, Keap1 seems to exert a broad Nrf2 flux control mainly in response to compounds able to modify the redox-sensitive Cys within Keap1, whereas GSK-3/β-TrCP performs a fine Nrf2 tuning in response to signaling events. Both mechanisms cooperate to adapt Nrf2 flux and the subsequent phase 2 response to specific demands aimed at maintaining redox homeostasis and protecting cells against oxidative damage.

by several signaling kinases. Thus, protein kinase C has been claimed to modulate Nrf2 activity by phosphorylating Ser40 in its Neh2 domain, and this leads to a disruption of the interaction between Nrf2 and Keap1 [40,41]. Regulation of Nrf2 subcellular localization may also be influenced by a signaling pathway that involves GSK-3 [42] and downstream tyrosine kinases of the Src family that phosphorylate Tyr568 at the carboxyl end of Nrf2 [43]. Other kinases including CK2 [44,45] and PERK [46] may also regulate Nrf2 by phosphorylation but the specific residues in the CNC-bZIP factor that are modified have not been clearly identified.

Among the various signaling cascades, a large number of studies have reported that chemopreventive agents activate the PI3K/Akt axis and the three main MAP kinase cascades ERK1/2, p38, and JNK, but with different efficiencies that depend on the compound under investigation (see the introduction). The molecular mechanisms involved in stimulation of these kinases by chemopreventive agents remain uncertain, but evidence suggests that some may alter the balance between phosphorylation and dephosphorylation by inhibiting redox-sensitive phosphatases. Two examples are inhibition of PTEN by tBHQ [47] and OCCD [25], both of which lead to activation of Akt. Regarding MAP kinases, it is less clear how xenobiotic drugs might activate ERK, p38, and JNK and if they are all relevant in Nrf2 activation. In the case of JNK, it is well documented that its upstream kinase ASK1 is sensitive to oxidative stress through the interaction with thioredoxin [48]. Regulation of Nrf2 by different signaling pathways is further complicated by possible cross talk between them [49].

We have used NDGA as a paradigm to determine how drugs that activate several signaling pathways might signal to Nrf2. Cells of epithelial and mesenchyme origin, LLC-PK1 and MEFs, respectively, exhibited different Nrf2 induction kinetics. We attribute this difference to the fact that these cells vary in receptor subsets and to the reported inhibitory effect of NDGA on plasma membrane receptors. Thus, NDGA inhibits insulin-like receptor-1 [50,51], bradykinin receptor [52], or transforming growth factor  $\beta$  type 1 receptor [53], among others. In any case, NDGA induced Nrf2 in both cell types. Fig. 11 depicts the most relevant findings of this study on NDGA signaling to Nrf2 in MEFs. We found that during the first hours of NDGA treatment, Akt and p38 were inhibited with similar kinetics, whereas little or no effect was observed for ERK1/2 and JNK. However, at longer time points NDGA activated these signaling pathways either slightly (Akt) or grossly (p38, JNK, ERK1/2). The increase in Nrf2 protein levels followed kinetics parallel to those for phosphorylation of Akt, p38, and JNK. Very importantly, similar kinetics were observed in Keap1-deficient MEFs, indicating that the regulation of Nrf2 stability by these signaling pathways is independent of the canonical Keap1-mediated mechanism of Nrf2 degradation. Indeed, Nrf2 mutants with disrupted Neh2 and Neh6 domains and chimeric proteins carrying the Neh2 and Neh6 domains fused to CFP and EGFP, respectively, demonstrated that not only the Neh2/Keap1 interaction but also the Neh6 degron is relevant for Nrf2 stability in response to NDGA.

Although several studies have described the up-regulation of Nrf2 by PI3K/Akt and by MAPKs the mechanisms by which this occurs remain elusive. Regarding MAPKs, several serine/threonine residues have been identified as targets of MAPK-mediated phosphorylation but direct phosphorylation of Nrf2 by MAPKs has been reported to have little effect on Nrf2 transcriptional activity [54]. Therefore, in this study we examined the involvement of GSK-3 in the activation of Nrf2 by stimulation of PI3K/Akt and MAPK. This decision was based on our previous reports indicating that GSK-3 down-regulates Nrf2 after oxidant damage in nerve cells subjected to  $H_2O_2$  or kainate [55,56] and that activation of the muscarinic M1 receptor activates a signaling pathway that leads to GSK-3 inhibition and Nrf2 up-regulation [57]. The molecular mechanisms involved in this functional interference may be related to the regulation of

Nrf2 subcellular localization [42,58] or to modulation of Nrf2 stability at the newly reported Neh6 phospho-degron that is regulated by GSK-3 [5].

GSK-3 is inhibited after stimulation by growth factors that activate PI3K/Akt and ERK1/2. Inhibition is predominantly achieved through phosphorylation at a conserved N-terminal serine (Ser21 in GSK-3 $\alpha$  and Ser9 in GSK-3 $\beta$ ) by Akt [59]. On the other hand, the stress-induced p38 MAPK family (and probably the JNK family) can phosphorylate Thr390 of human GSK-3 $\beta$  (Ser289 of mouse GSK-3 $\beta$ ), reducing its activity [60]. Therefore, in this study we analyzed the phosphorylation of Ser9 and Thr390 as two indicators of inhibition of GSK-3. We found that NDGA cooperated with a GSK-3 inhibitor to increase Nrf2 protein levels and that it inactivated GSK-3 $\beta$  as indicated by increased phosphorylation of Ser9 and Thr390 in this kinase. This means that GSK-3 $\beta$  integrated inhibitory signals attributed to growth factors (PI3K/Akt) and stress (p38 and JNK). The maximal increase in Nrf2 levels corresponds to the time of highest p38 and JNK activity as determined with activation-specific phospho-antibodies, suggesting that in the case of NDGA, modulation of these kinases may be most relevant. Whereas most studies with chemopreventive compounds, including ours, suggest that p38 activates Nrf2 [61], genetic deletion or overexpression of dominant negative forms of this kinase family leads to Nrf2 inhibition [62]. This controversy suggests that several kinase cascades combine to modulate Nrf2 and may lead to different outcomes. Our results suggest that such signaling integration may take place partially at the level of GSK-3 $\beta$ , which modulates the Neh6 degron, but it may also partially occur through other kinases that modulate the Neh2 degron.

We found that treatment with NDGA prevented  $H_2O_2$ -induced cell death, intracellular accumulation of ROS, and mitochondrial depolarization. These effects were associated with nuclear localization of Nrf2, indicative of activation of its transcriptional activity, as also demonstrated by an increase in activation of the ARE regulatory sequence and in HO-1 protein levels. Because Nrf2 controls the expression of antioxidant proteins, this study suggests that by maintaining redox homeostasis Nrf2 is indirectly preventing the oxidant activity of  $H_2O_2$ . Thus, exposure of mitochondria to oxidative stress, such as  $H_2O_2$ , promotes opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP), resulting in membrane depolarization, uncoupling of oxidative phosphorylation, and potentially cell death. In our study, we obtained evidence that NDGA, acting through the Nrf2 pathway of antioxidant gene expression, increases the resistance of mitochondria to redox-regulated PTP opening. A recent study [63] has described in greater detail that another Nrf2 inducer, sulforaphane, increases liver mitochondrial antioxidant defenses and inhibits redox-sensitive PTP opening. The critical role of HO-1 in protection against  $H_2O_2$ -induced cell death was further confirmed by using the inhibitor SnMP, which abolished the protective effect induced by NDGA. We speculate that products of HO-1 reaction such as carbon monoxide and biliverdin/bilirubin may be involved in this protective effect. In fact it has been shown that these products exhibit antioxidant properties [64]. The present data expand our previous findings in cultured neurons [37,65], supporting that NDGA also exerts antioxidant effects in an indirect way.

Our study explains evidence accumulated in past years on the regulation of Nrf2 by phytochemicals and cancer-chemopreventive compounds that activate multiple signaling cascades and identifies GSK-3 $\beta$  as an integrator of these signaling pathways to modulate Nrf2 stability at the level of the Neh6 phosphodegron.

Supplementary materials related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.003](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.003).

## Acknowledgments

This work was supported by CONACYT Grants 89641 and 129838 and by PAPIIT (DGAPA, UNAM) IN201910 and by MICINN Grant SAF2010-18722 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.



Patricia Rada is the recipient of a Formación de Profesorado Universitario fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We thank Dr. John Hayes (Biomedical Research Institute, Ninewells Hospital and Medical School, University of Dundee, Dundee DD1 9SY, Scotland, UK) for advice and critical reading of the manuscript.

## References

- [1] Taguchi, K.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* **16**:123–140; 2011.
- [2] Kensler, T. W.; Wakabayashi, N.; Biswal, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1–Nrf2–ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**: 89–116; 2007.
- [3] Alam, J.; Stewart, D.; Touchard, C.; Boinapally, S.; Choi, A. M.; Cook, J. L. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* **274**:26071–26078; 1999.
- [4] McMahon, M.; Thomas, N.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Hayes, J. D. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J. Biol. Chem.* **279**:31556–31567; 2004.
- [5] Rada, P.; Rojo, A. I.; Chowdhry, S.; McMahon, M.; Hayes, J. D.; Cuadrado, A. SCF/β-TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* **31**: 1121–1133; 2011.
- [6] Kobayashi, A.; Kang, M. I.; Okawa, H.; Ohtsui, M.; Zenke, Y.; Chiba, T.; Igarashi, K.; Yamamoto, M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 7130–7139; 2004.
- [7] Cullinan, S. B.; Gordan, J. D.; Jin, J.; Harper, J. W.; Diehl, J. A. The Keap1–BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3–Keap1 ligase. *Mol. Cell. Biol.* **24**:8477–8486; 2004.
- [8] Zhang, D. D.; Lo, S. C.; Cross, J. V.; Templeton, D. J.; Hannink, M. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.* **24**:10941–10953; 2004.
- [9] Furukawa, M.; Xiong, Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3–Roc1 ligase. *Mol. Cell. Biol.* **25**:162–171; 2005.
- [10] McMahon, M.; Thomas, N.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Hayes, J. D. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2–Keap1 complex. *J. Biol. Chem.* **281**:24756–24768; 2006.
- [11] Tong, K. I.; Kobayashi, A.; Katsuoka, F.; Yamamoto, M. Two-site substrate recognition model for the Keap1–Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol. Chem.* **387**:1311–1320; 2006.
- [12] Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Cole, R. N.; Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Yamamoto, M.; Talalay, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:11908–11913; 2002.
- [13] Kobayashi, M.; Yamamoto, M. Nrf2–Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme Regul.* **46**: 113–140; 2006.
- [14] Zhang, D. D.; Hannink, M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* **23**:8137–8151; 2003.
- [15] Wakabayashi, N.; Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Kang, M. I.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W.; Talalay, P. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:2040–2045; 2004.
- [16] Itoh, K.; Mimura, J.; Yamamoto, M. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid. Redox Signal.* **13**:1665–1678; 2010.
- [17] Fuchs, S. Y.; Spiegelman, V. S.; Kumar, K. G. The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene* **23**: 2028–2036; 2004.
- [18] Hayes, J. D.; McMahon, M.; Chowdhry, S.; Dinkova-Kostova, A. T. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1–Nrf2 pathway. *Antioxid. Redox Signal.* **13**:1713–1748; 2010.
- [19] Dinkova-Kostova, A. T.; Massiah, M. A.; Bozak, R. E.; Hicks, R. J.; Talalay, P. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:3404–3409; 2001.
- [20] Holland, R.; Fishbein, J. C. Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1. *Antioxid. Redox Signal.* **13**:1749–1761; 2010.
- [21] Martin, D.; Rojo, A. I.; Salinas, M.; Diaz, R.; Gallardo, G.; Alam, J.; De Galarreta, C. M.; Cuadrado, A. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J. Biol. Chem.* **279**:8919–8929; 2004.
- [22] Lee, J. M.; Hanson, J. M.; Chu, W. A.; Johnson, J. A. Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **276**:20011–20016; 2001.
- [23] Balogun, E.; Hoque, M.; Gong, P.; Killeen, E.; Green, C. J.; Foresti, R.; Alam, J.; Motterlini, R. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J.* **371**:887–895; 2003.
- [24] Chartoumpekis, D.; Ziros, P. G.; Psyrrianni, A.; Kyriazopoulou, V.; Papavassiliou, A. G.; Habeos, I. G. Simvastatin lowers reactive oxygen species level by Nrf2 activation via PI3K/Akt pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**:463–466; 2010.
- [25] Pitha-Rowe, I.; Liby, K.; Royce, D.; Sporn, M. Synthetic triterpenoids attenuate cytotoxic retinal injury: cross-talk between Nrf2 and PI3K/AKT signaling through inhibition of the lipid phosphatase PTEN. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**:5339–5347; 2009.
- [26] Kachadourian, R.; Pugazhenthi, S.; Velmurugan, K.; Backos, D. S.; Franklin, C. C.; McCord, J. M.; Day, B. J. 2',5'-Dihydroxychalcone-induced glutathione is mediated by oxidative stress and kinase signaling pathways. *Free Radic. Biol. Med.* **51**: 1146–1154; 2011.
- [27] Yao, P.; Nussler, A.; Liu, L.; Hao, L.; Song, F.; Schirmeier, A.; Nussler, N. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *J. Hepatol.* **47**:253–261; 2007.
- [28] Chen, C. Y.; Jang, J. H.; Li, M. H.; Surh, Y. J. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**:993–1000; 2005.
- [29] Choi, B. M.; Kim, B. R. Upregulation of heme oxygenase-1 by brazilin via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways and its protective effect against oxidative injury. *Eur. J. Pharmacol.* **580**:12–18; 2008.
- [30] Na, H. K.; Kim, E. H.; Jung, J. H.; Lee, H. H.; Hyun, J. W.; Surh, Y. J. (–)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **476**:171–177; 2008.
- [31] Hwang, Y. P.; Jeong, H. G. The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress. *FEBS Lett.* **582**:2655–2662; 2008.
- [32] Youngren, J. F.; Gable, K.; Penaranda, C.; Maddux, B. A.; Zavadovskaya, M.; Lobo, M.; Campbell, M.; Kerner, J.; Goldfine, I. D. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits the IGF-1 and c-erbB2/HER2/neu receptors and suppresses growth in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **94**:37–46; 2005.
- [33] Arteaga, S.; Andrade-Cetto, A.; Cardenas, R. Larrea tridentata (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J. Ethnopharmacol.* **98**:231–239; 2005.
- [34] Dinkova-Kostova, A. T.; Talalay, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food Res.* **52** (Suppl. 1):S128–S138; 2008.
- [35] Floriano-Sanchez, E.; Villanueva, C.; Medina-Campos, O. N.; Rocha, D.; Sanchez-Gonzalez, D. J.; Cardenas-Rodriguez, N.; Pedraza-Chaverri, J. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic. Res.* **40**:523–533; 2006.
- [36] Galano, A.; Macias-Ruvalcaba, N. A.; Medina Campos, O. N.; Pedraza-Chaverri, J. Mechanism of the OH radical scavenging activity of nordihydroguaiaretic acid: a combined theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem. B* **114**: 6625–6635; 2010.
- [37] Guzman-Beltran, S.; Espada, S.; Orozco-Ibarra, M.; Pedraza-Chaverri, J.; Cuadrado, A. Nordihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress. *Neurosci. Lett.* **447**: 167–171; 2008.
- [38] Barrera, D.; Maldonado, P. D.; Medina-Campos, O. N.; Hernandez-Pando, R.; Ibarra-Rubio, M. E.; Pedraza-Chaverri, J. HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. *Free Radic. Biol. Med.* **34**:1390–1398; 2003.
- [39] Im, J. Y.; Han, P. L. Nordihydroguaiaretic acid induces astroglial death via glutathione depletion. *J. Neurosci. Res.* **85**:3127–3134; 2007.
- [40] Bloom, D. A.; Jaiswal, A. K. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from IκNrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**:44675–44682; 2003.
- [41] Huang, H. C.; Nguyen, T.; Pickett, C. B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **277**:42769–42774; 2002.
- [42] Salazar, M.; Rojo, A. I.; Velasco, D.; de Sagarra, R. M.; Cuadrado, A. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* **281**:14841–14851; 2006.
- [43] Kaspar, J. W.; Jaiswal, A. K. Tyrosine phosphorylation controls nuclear export of Fyn, allowing Nrf2 activation of cytoprotective gene expression. *FASEB J.* **25**: 1076–1087; 2011.
- [44] Pi, J.; Bai, Y.; Reece, J. M.; Williams, J.; Liu, D.; Freeman, M. L.; Fahl, W. E.; Shugar, D.; Liu, J.; Qu, W.; Collins, S.; Waalkes, M. P. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic. Biol. Med.* **42**:1797–1806; 2007.
- [45] Apopa, P. L.; He, X.; Ma, Q. Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **22**:63–76; 2008.
- [46] Cullinan, S. B.; Zhang, D.; Hannink, M.; Arvisais, E.; Kaufman, R. J.; Diehl, J. A. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.* **23**:7198–7209; 2003.
- [47] Sakamoto, K.; Iwasaki, K.; Sugiyama, H.; Tsuji, Y. Role of the tumor suppressor PTEN in antioxidant responsive element-mediated transcription and associated histone modifications. *Mol. Biol. Cell* **20**:1606–1617; 2009.
- [48] Saitoh, M.; Nishitoh, H.; Fujii, M.; Takeda, K.; Tobiume, K.; Sawada, Y.; Kawabata, M.; Miyazono, K.; Ichijo, H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**:2596–2606; 1998.

- [49] Kim, A. H.; Khursigara, G.; Sun, X.; Franke, T. F.; Chao, M. V. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* **21**:893–901; 2001.
- [50] Rowe, D. L.; Ozbay, T.; Bender, L. M.; Nahta, R. Nordihydroguaiaretic acid, a cytotoxic insulin-like growth factor-I receptor/HER2 inhibitor in trastuzumab-resistant breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* **7**:1900–1908; 2008.
- [51] Friedlander, T. W.; Weinberg, V. K.; Huang, Y.; Mi, J. T.; Formaker, C. G.; Small, E. J.; Harzstark, A. L.; Lin, A. M.; Fong, L.; Ryan, C. J. A phase II study of insulin-like growth factor receptor inhibition with nordihydroguaiaretic acid in men with non-metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Oncol. Rep.* **27**:3–9; 2012.
- [52] Ueno, D.; Yabuki, A.; Obi, T.; Shiraiishi, M.; Nishio, A.; Miyamoto, A. Characterization of bradykinin-induced endothelium-independent contraction in equine basilar artery. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **32**:264–270; 2009.
- [53] Li, F.; Pham, J. D.; Anderson, M. O.; Youngren, J. F. Nordihydroguaiaretic acid inhibits transforming growth factor beta type 1 receptor activity and downstream signaling. *Eur. J. Pharmacol.* **616**:31–37; 2009.
- [54] Sun, Z.; Huang, Z.; Zhang, D. D. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One* **4**:e6588; 2009.
- [55] Rojo, A. I.; Rada, P.; Egea, J.; Rosa, A. O.; Lopez, M. G.; Cuadrado, A. Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal cell death. *Mol. Cell. Neurosci.* **39**:125–132; 2008.
- [56] Rojo, A. I.; Sagarra, M. R.; Cuadrado, A. GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J. Neurochem.* **105**:192–202; 2008.
- [57] Espada, S.; Rojo, A. I.; Salinas, M.; Cuadrado, A. The muscarinic M1 receptor activates Nrf2 through a signaling cascade that involves protein kinase C and inhibition of GSK-3beta: connecting neurotransmission with neuroprotection. *J. Neurochem.* **110**:1107–1119; 2009.
- [58] Niture, S. K.; Jain, A. K.; Shelton, P. M.; Jaiswal, A. K. Src subfamily kinases regulate nuclear export and degradation of the transcription factor Nrf2 to switch off Nrf2-mediated antioxidant activation of cytoprotective gene expression. *J. Biol. Chem.* **286**:28821–28832; 2011.
- [59] van Weeren, P. C.; de Bruyn, K. M.; de Vries-Smits, A. M.; van Lint, J.; Burgering, B. M. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation: characterization of dominant-negative mutant of PKB. *J. Biol. Chem.* **273**:13150–13156; 1998.
- [60] Thornton, T. M.; Pedraza-Alva, G.; Deng, B.; Wood, C. D.; Aronshtam, A.; Clements, J. L.; Sabio, G.; Davis, R. J.; Matthews, D. E.; Doble, B.; Rincon, M. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* **320**:667–670; 2008.
- [61] McNally, S. J.; Harrison, E. M.; Ross, J. A.; Garden, O. J.; Wigmore, S. J. Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int. J. Mol. Med.* **19**:165–172; 2007.
- [62] Keum, Y. S.; Yu, S.; Chang, P. P.; Yuan, X.; Kim, J. H.; Xu, C.; Han, J.; Agarwal, A.; Kong, A. N. Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res.* **66**:8804–8813; 2006.
- [63] Greco, T.; Shafer, J.; Fiskum, G. Sulforaphane inhibits mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **51** (12):2164–2171; 2011.
- [64] Orozco-Ibarra, M.; Estrada-Sanchez, A. M.; Massieu, L.; Pedraza-Chaverri, J. Heme oxygenase-1 induction prevents neuronal damage triggered during mitochondrial inhibition: role of CO and bilirubin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**:1304–1314; 2009.
- [65] Cardenas-Rodriguez, N.; Guzman-Beltran, S.; Medina-Campos, O. N.; Orozco-Ibarra, M.; Massieu, L.; Pedraza-Chaverri, J. The effect of nordihydroguaiaretic acid on iodoacetate-induced toxicity in cultured neurons. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **23**:137–142; 2009.

**Structural and functional characterization of Nrf2 degradation  
by the GSK-3/β-TrCP axis**

Patricia Rada<sup>1\*</sup>, Ana I. Rojo<sup>1,2\*</sup>, Nathalie Evrard-Todeschi<sup>3</sup>, Nadia G. Innamorato<sup>1</sup>,  
Axelle Cotte<sup>3</sup>, Tomasz Jaworski<sup>4,§</sup>, Herman Devijver<sup>4</sup>, María Flor García-Mayoral<sup>5</sup>,  
Fred Van Leuven<sup>4</sup>, John D. Hayes<sup>6</sup>, Gildas Bertho<sup>3#</sup> and Antonio Cuadrado<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”  
UAM-CSIC, Centro de Investigación en Red Sobre Enfermedades Neurodegenerativas  
(CIBERNED).

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina,  
Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Université Paris Descartes, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et  
Toxicologiques (UMR 8601 CNRS), Paris, France.

<sup>4</sup> Experimental Genetics Group-LEGTEGG, Department of Human Genetics,  
KULeuven, Leuven, Belgium.

<sup>5</sup> Departamento de Química Física Biológica, Instituto de Química Física Rocasolano,  
CSIC, Madrid, Spain.

<sup>6</sup> Biomedical Research Institute, Ninewells Hospital and Medical School, University of  
Dundee, Dundee DD1 9SY, Scotland, United Kingdom.

<sup>§</sup> Present address: Laboratory of Neurobiology, Nencki Institute of Experimental  
Biology, Warsaw, Poland.

**Running title:** Degradation of Nrf2 by GSK-3/β-TrCP

**Word counts:** Materials and Methods, 1521; Introduction, Results & Discussion, 4410.

\* both authors must be considered as first authors

**# Corresponding authors:**

Prof. Antonio Cuadrado  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
“Alberto Sols” UAM-CSIC  
C/ Arturo Duperier, 4  
28029 Madrid  
Spain  
E-mail: antonio.cuadrado@uam.es  
Tel: +34915854383

Dr. Gildas Bertho  
Université Paris Descartes  
UMR 8601 CNRS  
45, rue des Saint-Pères  
75006 Paris  
France  
E-mail: gildas.bertho@parisdescartes.fr  
Tel: +33142862182



42 **ABSTRACT**

43 Transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2) is a master regulator of a  
44 genetic program termed the phase 2 response that controls redox homeostasis and  
45 participates in multiple aspects of physiology and pathology. Nrf2 protein stability is  
46 regulated by two E3 ubiquitin ligase adaptors: Keap1, and  $\beta$ -TrCP with the later only  
47 recently reported. Here, 2D-gel electrophoresis and site directed mutagenesis allowed us  
48 to identify two serines of Nrf2 that are phosphorylated by GSK-3 $\beta$  in the DSGISL  
49 sequence. Nuclear Magnetic Resonance studies defined key residues of this phopho-  
50 sequence involved in docking to the WD40 propeller of  $\beta$ -TrCP, through electrostatic  
51 and hydrophobic interactions. We also identified three arginine residues of  $\beta$ -TrCP that  
52 participate in Nrf2 docking. The functional relevance of the GSK-3/ $\beta$ -TrCP degradation  
53 mechanism was established *in vivo*, using mice with hippocampal absence of GSK-3 $\beta$ .  
54 These animals exhibited increased levels of Nrf2 and phase 2 gene products. This study  
55 establishes the structural parameters of the interaction of Nrf2 with the GSK-3/ $\beta$ -TrCP  
56 axis and its functional relevance in the regulation of Nrf2 by the signaling pathways that  
57 impinge on GSK-3.

58 **Key words:** oxidative stress / proteasome / cell signaling / ubiquitin

59

## 60 INTRODUCTION

61       Organisms have evolved complex defense mechanisms to prevent and control  
62 damage produced by harmful endogenous and exogenous agents that are capable of  
63 disrupting normal cellular functions. In recent years it has become apparent that the  
64 transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2) plays a central role in controlling both  
65 intrinsic and inducible resistance to oxidants and electrophiles (38). It was initially  
66 reported as a cap'n'collar (CNC)-basic-region leucine zipper (bZIP) transcription factor  
67 that controls induction of drug metabolism genes that contain an antioxidant response  
68 element (ARE) in their promoter regions (12, 43). Nrf2 is now considered to be a master  
69 regulator of redox homeostasis because it controls the expression of over 100 genes  
70 involved in defense against reactive oxygen species and electrophiles.

71       In common with other transcription factors involved in protection against stress,  
72 such as HIF1 $\alpha$ , HSF, ATF4 and NF- $\kappa$ B, basal activity of Nrf2 is restricted to low levels.  
73 Indeed, high constitutive Nrf2 activity has been observed in a number of tumors, where  
74 it is associated with increased cell proliferation and resistance to chemotherapeutic  
75 drugs. Interestingly, in a proportion of lung cancers, high Nrf2 activity is due to somatic  
76 mutations that enable this factor to evade, at least partially, degradation through the  
77 ubiquitin-proteasome pathway (10, 41).

78       Nrf2 is principally controlled through regulation of protein turnover by the  
79 ubiquitin-proteasome system, exhibiting a half-life of about 30 min. More than 100  
80 different protein adaptors mediate the interaction of a few E3 ubiquitin ligases with their  
81 substrates. These adaptors confer selectivity to the process by their ability to recognize  
82 unique sequences in the target protein that are required for degradation (i.e. degrons).  
83 Many of these cis-acting sequences contain several Ser or Thr residues that require to be  
84 phosphorylated in order to create a phosphodegron that is recognized by the adaptor E3

85 ligase protein. In other cases, the phosphorylated Ser or Thr residues may be substituted  
86 with negatively charged amino acids that form a permanent docking site for their  
87 appropriate E3 ligase adaptor protein. The Nrf2 protein appears to be controlled through  
88 both degron and phosphodegron sequences. It is constitutively recognized by the  
89 substrate adaptor Keap1 in its N-terminal Neh2 domain and presented for Cul3 (cullin-  
90 3)-based E3 ligase ubiquitination and proteasomal degradation (5, 9, 19-20, 24-25, 42,  
91 49). Keap1 is inhibited by thiol-reactive compounds and upon exposure to such  
92 stressors Keap1-mediated ubiquitination of Nrf2 by Cul3 ceases to occur. Therefore,  
93 this regulatory mechanism is unusual insofar as redox stress regulation of Nrf2 does not  
94 occur through modification of the degron in the transcription factor but through  
95 modification of the Keap1 adaptor. Whilst this model explains how Nrf2 is up-regulated  
96 by soft electrophiles other regulatory mechanisms must exist. For example, Nrf2 is  
97 more abundant in metabolically active tissues than in those that are less metabolically  
98 active (13) and it is influenced by growth factor signaling through a Keap1-independent  
99 mechanism.

100       Recently we reported the existence of a previously unrecognized phosphodegron  
101 in Nrf2 that requires the concerted action of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and  
102 the E3 ligase adaptor  $\beta$ -transducin repeat-containing protein ( $\beta$ -TrCP<sup>1</sup>) (34). In  
103 particular, we provided evidence that GSK-3 might phosphorylate Nrf2 somewhere  
104 within a cluster of Ser residues in the Neh6 domain of Nrf2 that overlaps with a putative  
105 destruction motif for  $\beta$ -TrCP. However, the specific residues that are phosphorylated by  
106 GSK-3 or the residues that interact with  $\beta$ -TrCP have not been identified. Also, the

---

<sup>1</sup> Note that two mammalian  $\beta$ -TrCP paralogues exist (i.e.  $\beta$ -TrCP1 and  $\beta$ -TrCP2) which possess similar properties. In this paper we have employed the general term  $\beta$ -TrCP unless specific experimental details are described.

functional consequences of this degradation pathway are not known. In the current study, we have characterized the Ser residues that are phosphorylated by GSK-3 $\beta$  to create the  $\beta$ -TrCP-dependent phosphodegron. By using a combination of transfer-NMR and docking experiments (33), we have identified the phosphorylated residues of Nrf2 that contact with specific amino acids that comprise the binding pocket in the WD40 propeller of  $\beta$ -TrCP. Finally, we show that the expression of Nrf2-target genes is increased in the hippocampus of mice that lack GSK-3 $\beta$ .

114

## 115 MATERIALS AND METHODS

*Neuron specific GSK-3 $\beta$ -knockout mice.* Mice with postnatal neuronal deficiency of GSK-3 $\beta$  were generated by the Cre/lox system as described (16). Transgenic mice with the GSK-3 $\beta$  gene flanked by loxP sites were crossed with mice expressing Cre recombinase under the Thy1 gene promoter. Mice with two floxed GSK-3 $\beta$  alleles but not expressing Cre-recombinase (denoted -Cre) were used as controls for the double transgenic mice that express Cre-recombinase (denoted +Cre) and that lack both GSK-3 $\beta$  alleles postnatally and only in neurons (16). All experiments were approved by the KULeuven ethical commission, according institutional Belgian and European guidelines (86/609/EEC, 2003/65/EC European Council Directives). Animals were anesthetized with 8 mg/kg ketamine and 1.2 mg/kg xylazine, and depending on the experiment, perfused with 4% paraformaldehyde for immunohistochemistry analysis or sacrificed by cervical dislocation and the hippocampus rapidly frozen at -80 °C for RNA and protein analysis.

*Cell culture and reagents.* Human embryonic kidney (HEK)293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 80  $\mu$ g/ml gentamycin. Transient transfections were performed with calcium

phosphate, using reagents from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) or with TransFectin™ lipid reagent from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). SB216763 and MG132 were from Sigma-Aldrich.

*Plasmids.* Expression vectors pcDNA3.1-mNrf2-V5/HisB and pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE</sup>-V5/HisB were previously described (26). Vectors pCGN-HA-GSK-3β<sup>Δ9</sup> and pCGN-HA-GSK-3β<sup>Y216F</sup> were provided by Dr. Akira Kikuchi (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hiroshima University). Plasmid encoding β-TrCP<sup>ΔFbox</sup> (pcDNA3β-TrCP<sup>ΔFbox</sup>-HA) was provided by Dr. Serge Y. Fuchs (Department of Animal Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA). Expression construct encoding β-TrCP1 (pcDNA3-Flag-β-TrCP1) was provided by Dr. Tomoki Chiba (Department of Molecular Biology, University of Tsukuba, Japan). Chimeric construct Δ1 of the pEYFP-mNrf2-V5 series was generated as described in (37) for plasmid named pEYFP-Nrf2-V5. The other chimeras were generated using Δ1 as template with a GC-Rich PCR system (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). N-terminal deletions were generated with a common reverse primer: 5'-TCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCAT-3'. The forward primers were as follows: Δ2, 5'-TAACGGATCCTTCATAGCAGAGCCCAGTGAC-3'; Δ3, 5'-TAACGGATCCAAAGCTTTCAACCCGAAGCAC-3'; Δ4, 5'-TAACGGATCCCAGAACGGCCCTAAAGCACAG-3', and Δ5, 5'-TAACGGATCCAAAAATCATTAACCTCCCTGTT-3'. The amplified fragments were digested with BamHI (underlined) and PmeI and cloned in pEYFP-CI between the BglII and SmaI sites. pcDNA3.1-mNrf2<sup>ΔETGE 6S/6A</sup>-V5/HisB containing the indicated six mutations S335A, S338A, S342A, S347A, S351A and S355A was previously described in (34).

156 Plasmids encoding EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 and EYFP-mNrf2<sup>(317-372) 6S/6A</sup>-V5  
157 were generated using the following primers: *Forward* 5'-  
158 TAACAGATCTGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTC-3' and *Reverse* 5'-  
159 TAACAGATCTATCTAGCTCCTCCATTTCCGAGTCACT-3' and pEYFP-mNrf2-V5  
160 and pEYFP-mNrf2<sup>6S/6A</sup>-V5 as templates, respectively. Underlined HindIII sites were  
161 included in all primers to allow the re-ligation of the PCR product. Mutant mNrf2 and  
162 β-TrCP constructs were generated using GeneTailor™ site-directed mutagenesis system  
163 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the primers are shown in Table A of supplemental  
164 material. All sequences were verified by automated sequencing.

165 *Immunoblotting.* The primary antibodies used were anti-V5 and anti-β-TrCP  
166 (Invitrogen), anti-HA (Covance, Berkeley, CA, USA), anti-GFP and anti-Flag (Sigma  
167 Aldrich), anti-GSK-3β (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), anti-Keap1 and β-actin  
168 from Santa Cruz Biotechnology, sc-33569 and sc-1616 respectively (Santa Cruz,  
169 Delaware, CA, USA), anti-GSTM5 (generated by Dr Hayes' laboratory), anti-GCLM,  
170 anti-GCLC (a kind gifts of Dr Terrance Kavanagh, University of Washington, USA).  
171 Cell lysates were resolved by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes  
172 (Millipore, Billerica, MA, USA). These membranes were analyzed using the appropriate  
173 primary antibodies and peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were  
174 detected by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

175 *Co-Immunoprecipitation.* Assays were performed as indicated in (34). The  
176 samples were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted. Mouse IgG TrueBlot  
177 (eBiosciences, San Diego, CA, USA) was used as peroxidase-conjugated secondary  
178 antibody (1:10000 dilution) to avoid interference with the 55 kDa heavy and 23 kDa  
179 light chains of the immunoprecipitating antibody.

180        *2D-PAGE*. Assays with lambda phosphatase ( $\lambda$ PPase) and 2D-gel  
181 electrophoresis were performed as described in (36). Reagents for 2D-PAGE were  
182 supplied by PlusOne-GE Healthcare.

183        *Peptide synthesis*. The Nrf2 peptide with residues 333-362 from the human  
184 sequence (4P-hNrf2) with phosphorylated serines at positions 344, 347, 351 and 356  
185 was purchased from Invitrogen. The Nrf2 peptide comprising residues 333-359 (2P-  
186 hNrf2) with phosphorylated serines at positions 344 and 347 was purchased from JPT  
187 Innovative Peptide Solutions (Berlin, Germany). The purity of both peptides was higher  
188 than 95% as determined by HPLC. Both peptides were N-acetylated and C-amidated at  
189 their respective termini.

190        *Purification of the WD repeat region from human protein  $\beta$ -TrCP1 fused to the*  
191 *Maltose Binding Protein (MBP)*. The method of the purification of MBP- $\beta$ -TrCP was  
192 previously described (32). Following this protocol, the final yield of purified MBP- $\beta$ -  
193 TrCP was 1.3 mg/L. This amount of purified recombinant protein was used to prepare  
194 the NMR samples.

195        *NMR Spectroscopy*. The experiments were run at 500.13 MHz for  $^1\text{H}$  on a  
196 Bruker AVANCE 500 spectrometer with a Linux PC workstation, using standard 5 mm  
197 or Shigemi 5 mm tubes with susceptibility matched to solvent  $^2\text{H}_2\text{O}$ /Water sample tubes  
198 with a 5 mm outer diameter. The spectra of the peptide at 2 mM sample concentration  
199 were recorded in 20 mM sodium phosphate buffer at pH 7.2, prepared in 95%  $\text{H}_2\text{O}$  and  
200 5%  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Two-dimensional NMR spectra were recorded in the phase-sensitive mode  
201 using the States-TPPI method (40). All experiments were carried out using either the  
202 WATERGATE pulse sequence for water suppression (30) or the excitation sculpting  
203 water suppression (11) to eliminate the solvent signal in  $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$  95:5 solution. The  
204 two-dimensional experiments COSY, TOCSY and NOESY spectra were recorded at



205 several temperatures within the 280-310 K range. 2D TOCSY spectra were recorded  
206 using a MLEV-17 spin-lock sequence (2) with a mixing time ( $\tau_m$ ) of 35 and 70 ms,  
207 respectively. 2D NOESY experiments were recorded using a mixing time ( $\tau_m$ ) of 100,  
208 200 or 500 ms. The heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectra were recorded at 280 K in the  
209 same conditions. For NMR experiments with  $\beta$ -TrCP, the ligand to protein ratio was set  
210 to 98:1 (1.6 mM 4P-Nrf2 or 2P-Nrf2 peptide, 17  $\mu\text{M}$  MBP- $\beta$ -TrCP protein). Chemical  
211 shift assignments referred to internal standard 3-(trimethylsilyl) propionic acid-2,2,3,3-  
212  $\text{d}_4$ , sodium salt (TSP- $\text{d}_4$ ). Transferred nuclear Overhauser effect (TRNOESY) spectra  
213 of 4P-Nrf2 or 2P-Nrf2 with  $\beta$ -TrCP were recorded using a mixing time ( $\tau_m$ ) of 100, 200  
214 or 500 ms.

215  $^1\text{H}$  STD NMR spectra of the protein-peptide mixtures were recorded at 500 MHz  
216 with 1024 scans and selective saturation of protein resonances at -3 ppm (on-resonance  
217 frequency) (30 ppm for reference spectra). At this frequency no peptide resonances are  
218 found whereas the significant line width of the protein signals still allows it to be  
219 selectively and uniformly saturated and be efficiently used for the STD-NMR  
220 technique. In order to achieve the desired selectivity and to avoid side-band irradiation,  
221 shaped pulses are employed for the saturation of the protein signals. STD-NMR spectra  
222 were acquired using a series of 40 equally spaced 50 ms Gaussian-shaped pulses for  
223 selective saturation (total saturation time  $\sim 2.05$  s), with 1 ms delay between the pulses.  
224 With an attenuation of 50 dB, the radio-frequency field strength for the selective  
225 saturation pulses in all the STD-NMR experiments was 190 Hz. The irradiation yields  
226 full saturation of the protein by efficient spin diffusion. Subtraction of FID values with  
227 on- and off-resonance protein saturation was achieved by phase cycling. Relative STD  
228 values were calculated by dividing STD signal intensities by the intensities of the

229 corresponding signals in a one-dimensional  $^1\text{H}$  NMR reference spectrum of the same  
230 sample recorded with 1024 scans and similar parameter conditions.

231 *Structure calculations.* The calculated distances were incorporated into a  
232 simulated annealing protocol within the program ARIA 2.3 (23). Details on the three-  
233 dimensional structure calculation were presented elsewhere (32). PyMOL (6) was used  
234 for the analysis and presentation of the results of structure determination. The final step  
235 of the work was a docking analysis using Surflex-Dock 2.0 (SYBYL X 1.2, Tripos  
236 Certara Company, St. Louis, MO, USA).

237 *Immunohistochemistry.* Animals were perfused, brains fixed, and 30- $\mu\text{m}$ -thick  
238 coronal sections obtained as previously described (35). Sections were treated as reported  
239 elsewhere (17) and incubated for 24 h at 4 °C with rabbit anti-GSK-3 $\beta$  (1:500; Cell  
240 Signaling). Secondary biotinylated anti-rabbit antibody was used at 1:1000 dilution for 1  
241 h at room temperature (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) and sections were  
242 subsequently developed by avidin-biotin peroxidase complex system following  
243 manufacturer's instructions (ABC Kit, Vector Labs). Finally, sections were incubated in  
244 Nissl's solution (0.1% Cresyl Violet (Sigma-Aldrich), 2.5 ml acetic acid 10%) at room  
245 temperature for 15 min, rinsed in deionized water for 5 min, dehydrated in graded  
246 alcohols, cleared in xylene and coverslipped.

247 *Analysis of mRNA levels.* Total RNA was extracted using TRIzol reagent  
248 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Reverse transcription and  
249 quantitative PCR was done as detailed in (Rada et al, 2011). Primer sequences are  
250 shown in Table B of supplemental material. Data analysis is based on the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method  
251 with normalization of the raw data to housekeeping genes as described in the  
252 manufacturer's manual (Applied Biosystems). All PCRs were performed in triplicate.

253 *Image analyses and statistics.* Different band intensities (density arbitrary units),  
254 corresponding to immunoblot detection of protein samples, were quantified using the  
255 MCID software (MCID, Cambridge, UK). Student's *t* test was used to assess  
256 differences between groups; a *p* value < 0.05 was considered significant. Unless  
257 indicated, all experiments were performed at least three times with similar results. The  
258 values in the graphs correspond to the mean of at least three samples. Results are  
259 expressed as mean ± SEM.

## 260 **RESULTS**

261 *The Neh6 domain of Nrf2 binds β-TrCP.* In order to map the domain of Nrf2 that  
262 interacts with β-TrCP, we transfected HEK293T cells with expression vectors for V5-  
263 tagged EYFP linked to various mNrf2 deletion mutants (see Fig. 1A) and a truncated  
264 version of β-TrCP that contains the WD40 propeller which participates in substrate  
265 recognition and binding but lacks its Fbox domain (β-TrCP<sup>ΔFbox</sup>) required for interaction  
266 with cullin1 (Fig. 1B). After transfection, the cells were maintained in serum-free  
267 medium for 16 h, to ensure that GSK-3β retains its activity (37). Pull-down of V5-  
268 tagged EYFP-Δ(1-5)Nrf2 chimeras showed that those that contained the Neh6 domain  
269 (i.e. Δ1-3) could associate with HA-tagged β-TrCP<sup>ΔFbox</sup> whereas those that lacked Neh6  
270 (i.e Δ4 and 5) could not (Fig. 1C and D). These results indicate that the Neh6 domain of  
271 Nrf2 interacts with the GSK-3/β-TrCP axis.

272 *Identification of Ser residues in the Neh6 domain phosphorylated by GSK-3.*  
273 Nrf2 contains a total of approx. 100 Ser, Thr and Tyr residues. The fact that it contains  
274 so many putative phosphorylation sites (Figure A of supplemental material) complicates  
275 the identification of modified residues. To simplify the task of identifying residues  
276 phosphorylated by GSK-3, we restricted our study to examination of residues in the

277 Neh6 domain. We therefore generated a fusion protein comprising EYFP and residues  
 278 317 to 372 of mouse Nrf2 (EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5) that contained the putative sites for  
 279 GSK-3 phosphorylation and  $\beta$ -TrCP binding. This protein migrated as two bands during  
 280 SDS-PAGE, and the retarded band was eliminated if cell lysates were treated with  $\lambda$ -  
 281 phosphatase ( $\lambda$ PPase) prior to electrophoresis, indicating that it was phosphorylated  
 282 under basal conditions (Fig. 2A left panels). By contrast, mutation of 6 serines to 6  
 283 alanines (residues 335, 338, 342, 347, 351 and 355) in this region (EYFP-mNrf2<sup>(317-  
 284 372)6S/6A</sup>-V5) rendered a protein with only the fast migrating form, indicating that at least  
 285 some of these 6 serines are phosphorylated (Fig. 2A, left panels). When EYFP-  
 286 mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 was expressed together with active GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$ , the pattern of mobility  
 287 was unchanged, precluding identification of residues phosphorylated by the kinase (Fig.  
 288 2A, right panels). We circumvented this problem by employing 2D-PAGE (Fig. 2C and  
 289 2D). HEK293T cells were co-transfected with EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 and either GSK-  
 290 3 $\beta^{Y216F}$  or GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$  and different modified forms of the fusion protein were resolved in  
 291 2D-PAGE and then blotted with anti-V5 antibody. Under these conditions, EYFP-  
 292 mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 was resolved into two rows of spots (Fig. 2C). When cell lysates were  
 293 pre-incubated with  $\lambda$ PPase, the chimeric protein migrated as three spots, indicating the  
 294 presence of post-translational modifications of the fluorescent protein that cannot be  
 295 attributed to phosphorylation (36) (Fig. 2D). More importantly however, when cells  
 296 were co-transfected with EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 and GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$  we observed an  
 297 increase in hyper-phosphorylated spots (Fig. 2C, filled arrows) and a decrease in hypo-  
 298 phosphorylated spots (Fig. 2C, empty arrows) compared to the pattern obtained in co-  
 299 transfection of EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 with the kinase inactive GSK-3 $\beta^{Y216F}$  protein  
 300 that used as a negative control.

301 To narrow down the putative sites of phosphorylation in the Neh6 domain of  
 302 mouse Nrf2, we analyzed the point mutants shown in Fig. 2B. The mutant EYFP-  
 303 mNrf2<sup>(317-372)6S/6A</sup>-V5) yielded a protein with a similar 2D-PAGE mobility pattern to  
 304 that of  $\lambda$ PPase-treated EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5, indicating that these Ser residues are  
 305 subject to basal and GSK-3-induced phosphorylation (Fig. 2E). When Ser to Ala  
 306 mutations were restricted to those at positions 335, 338, 342 and 347, the resulting  
 307 EYFP-mNrf2<sup>(317-372)4S/4A</sup>-V5 protein yielded the same 2D-PAGE pattern, indicating that  
 308 Ser<sup>351</sup> and Ser<sup>355</sup> are not phosphorylated (Fig. 2F). Examination by 2D-PAGE of a  
 309 mutant with both Ser<sup>335</sup> and Ser<sup>338</sup> changed to Ala (i.e. EYFP-mNrf2<sup>(317-372)2S/2A</sup>-V5)  
 310 recapitulated the pattern of phosphorylated spots observed under basal conditions with  
 311 only a minor increase in the size of the most acidic spot (Fig. 2G, filled arrow) and a  
 312 decrease in the most basic spot (Fig. 2G, empty arrow) produced by GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$ . This  
 313 mutant indicates that GSK-3 $\beta$  plays a minor role in phosphorylation of Ser342 and 347.  
 314 Finally, 2D-PAGE examination of a mutant with both Ser<sup>342</sup> and Ser<sup>347</sup> replaced with  
 315 Ala (EYFP-mNrf2<sup>(317-372)2SP/2AP</sup>-V5) yielded a new pattern that resembled that of  $\lambda$ PPase  
 316 but with minor spots that were enhanced in the presence of GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$  (Fig. 2H, filled  
 317 arrows). Taken together, these results indicate that Ser<sup>342</sup> and Ser<sup>347</sup> are basally  
 318 phosphorylated, while Ser<sup>335</sup> and Ser<sup>338</sup> are phosphorylated by GSK-3 $\beta$ .

319 *Identification of phosphoserines in Neh6 that interact with  $\beta$ -TrCP.* We used  
 320 NMR with two phosphopeptides designed around human Nrf2, denoted as 4P-hNrf2  
 321 and 2P-hNrf2, to identify residues in the Neh6 domain that are bound to  $\beta$ -TrCP.  
 322 Human Nrf2 is longer than mouse Nrf2, and the Neh6 domain is displaced by 9 residues  
 323 despite the fact that amino acid sequence is identical within the region studied here (see  
 324 Figure A of supplemental material). Therefore, to recapitulate basal and GSK-3-induced  
 325 phosphorylations, the 4P-hNrf2 peptide carried phosphoserines at positions 344, 347,

351 and 356 (equivalent to positions 335, 338, 342, 347 in mNrf2) whereas the 2P-hNrf2 carried phosphoserines only at positions 344 and 347 corresponding to GSK-3-induced phosphorylations (Fig. 3A). The complete assignment of resonances of both 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2 peptides was established by two-dimensional  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  TOCSY, and NOESY experiments. The  $^{13}\text{C}$  signals were assigned using  $^{13}\text{C}$ -edited HSQC spectra (46) on samples at  $^{13}\text{C}$  natural abundance. The chemical shifts of hNrf2 peptides free in solution and in the presence of a recombinant fusion protein made of Maltose Binding Protein and the WD40 propeller of  $\beta$ -TrCP (MBP- $\beta$ -TrCP) were analyzed at 280 K, pH 7.2, and are reported in Tables C to F of supplemental material. The sequential assignment of  $^1\text{H}$  resonances was carried out using a classical assignment strategy (48). The analysis of the  $\text{H}\delta(\text{i})$ - $\text{H}\alpha(\text{i}-1)$  NOE cross-peaks revealed the  $\text{X}(\text{i}-1)$ -Pro (i) bonds to be mainly *trans* (48). No *cis-trans* isomerization was detected across proline amide bonds.

The amide signal shift temperature coefficients ( $\Delta(\delta\text{NH})/\Delta T$ , in  $\text{ppb}\cdot\text{K}^{-1}$ ) were derived for all backbone amide protons in both peptides (Fig. 3B). For the residues involved in intramolecular hydrogen-bonding networks or hidden in the solvent-protected structural core, low absolute values of this coefficient are expected as compared with the range of values measured for random-coil peptides (3). The region between Asn<sup>340</sup> and pSer<sup>347</sup>, and particularly Gly<sup>345</sup>, gave the lowest values, between -7 and -4  $\text{ppb}\cdot\text{K}^{-1}$ , and can be considered to be at least partially protected from external water molecules. Therefore, the similar pattern observed for this region in 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2 peptides reveals that they possess similar structures. In the presence of  $\beta$ -TrCP, the highest chemical-shift variations ( $\Delta\delta$ ) were found roughly in the same region (<sup>344</sup>pSGIpSLN<sup>349</sup>) of both 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2 peptides and in pSer<sup>351</sup> and pSer<sup>356</sup> of 4P-hNrf2 peptide (Fig. 3C).

351 To further characterize the amino acids of Nrf2 involved in the interaction with  
352  $\beta$ -TrCP, we used Saturation Transfer Difference (STD) NMR experiments as they have  
353 been used successfully to characterize the interaction of  $\beta$ -TrCP with substrates such as  
354 Vpu (4),  $\beta$ -Catenin (27), I $\kappa$ B $\alpha$  (31) and ATF-4 (32). We observed Nrf2 signals in the  
355 STD spectrum at 280 K that indicated binding of  $\beta$ -TrCP to the peptides (Fig. 3D). The  
356 amide protons of pSer<sup>344</sup> and pSer<sup>347</sup> of 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2 peptides were largely  
357 involved with more than 80% relative STD intensities. Other residues in this region  
358 such as Ile<sup>346</sup> and Leu<sup>348</sup> exhibited close to 80% relative STD intensities suggesting that  
359 they also participate in binding through hydrophobic interactions. In 4P-hNrf2, pSer<sup>351</sup>  
360 and pSer<sup>356</sup> also displayed a high intensity in the STD spectrum. To determine the  
361 specificity of these interactions we repeated the STD experiment for 4P-hNrf2 at 293 K.  
362 At this higher temperature, the STD intensity was decreased (Fig. 3E), indicating  
363 dissociation of the complex. To take into account the STD signal reduction and to allow  
364 a better understanding of the temperature effect, a global reduction factor of 0.85 was  
365 applied for STD intensities at 293 K. The intensities at the N- and C-terminus of 4P-  
366 hNrf2 remained very similar at both temperatures, with mean values of about 50 to  
367 60%. However, the interaction of residues between Asn<sup>340</sup> and Ser<sup>360</sup> was reduced at  
368 293 K, but pSer<sup>344</sup>, Ile<sup>346</sup> and pSer<sup>347</sup> retained high STD values. These results suggest  
369 that the residues in the pSGIpS region are essential for the interaction of both 4P-hNrf2  
370 and 2P-hNrf2 peptides with  $\beta$ -TrCP. Interestingly, the interactions of pSer<sup>351</sup> and  
371 pSer<sup>356</sup> in 4P-hNrf2 were reduced at 293 K (Fig. 3E). These results indicate the essential  
372 role of pSer<sup>344</sup> and pSer<sup>347</sup> in interaction with  $\beta$ -TrCP, while pSer<sup>351</sup> and pSer<sup>356</sup> appear  
373 to be involved mainly in non-specific interactions.



374 *Molecular the interaction between the phosphodegron in Nrf2 and  $\beta$ -TrCP.* To  
 375 better understand the interaction between Nrf2 and  $\beta$ -TrCP we sought to elucidate the  
 376 structure of the complex formed between 2P-hNrf2 and purified MBP- $\beta$ -TrCP. The  
 377 calculation of the 2P-hNrf2 peptide bound structure was performed using distance  
 378 restraints derived from TRNOE spectra at 100 and 200 ms mixing times at 280 K in the  
 379 presence of MBP- $\beta$ -TrCP. From a total of 218 TRNOE cross-peaks, 108 were translated  
 380 into unambiguous restraints. Using the ARIA2.3 software, 50 structures of 2P-hNrf2  
 381 bound to  $\beta$ -TrCP were generated and their superimposition onto the DpSGIpS motif of  
 382 the five lowest energy structures is displayed in Fig. 4A. The presence of the  
 383 phosphorylated serines in the peptide induces a turn conformation also found in other  $\beta$ -  
 384 TrCP substrates (33). The backbone average root-mean-square difference (RMSD)  
 385 value for the DpSGIpS motif is  $1.2 \pm 0.6$  Å.

386 The model of the phospho-Nrf2/ $\beta$ -TrCP complex was built from docking  
 387 calculations starting from the lowest-energy bound structure obtained from the TRNOE  
 388 NMR experiment. Due to the high degree of flexibility, Surflex-Dock (15) calculations  
 389 were limited to 10 residues centered on the interaction motif <sup>341</sup>DSDpSGIpSLNT<sup>350</sup>.  
 390 The previously reported three-dimensional crystal structure of human  $\beta$ -TrCP in  
 391 complex with a 10-residue  $\beta$ -catenin peptide (PDB ID code 1P22) (47) was used as the  
 392 starting structure for the docking calculations. We obtained 32 poses of docking  
 393 conformers. The lowest-energy docking conformer of the DSDpSGIpSLNT sequence  
 394 was superimposed with the lowest-energy TRNOE bound structure on the DpSGIpS  
 395 sequence (Fig. 4B). The backbone RMSD values were  $1.9 \pm 0.6$  Å (DSDpSGIpSLNT)  
 396 and  $1.1 \pm 0.4$  Å (DpSGIpS). The turn motif is preserved in both structures but the  
 397 position of the phosphate groups changes. In contrast to the Nrf2 bound structure, we  
 398 found that the phosphate groups of pSer<sup>344</sup> and pSer<sup>347</sup> in the docked structure adopt a

399 lower energy conformation that optimizes the interaction with the surface of  $\beta$ -TrCP.  
 400 We superimposed the seven poses of docking conformers with the lowest scores (Fig.  
 401 4C) and found a good fit for the pSGI fragment and Leu<sup>348</sup> while the side chain of  
 402 pSer<sup>347</sup> was more flexible. The backbone RMSD value for the DpSGIpS motif is  $0.4 \pm$   
 403  $0.2 \text{ \AA}$  and for the sequence with the ten residues is  $0.9 \pm 0.5 \text{ \AA}$ . The lowest energy  
 404 structure of the complex is shown in Dreiding model (Fig. 4D). The amino acids of  $\beta$ -  
 405 TrCP that participate in hydrogen-bonding with Nrf2 are colored in green. Seven out of  
 406 ten hydrogen-bonds (H-bonds) involve the DpSGI motif and the remaining three  
 407 involve Asn<sup>349</sup>. The carbonyl and carboxyl groups of Asp<sup>343</sup> make two H-bonds with the  
 408  $\epsilon\text{NH}_2$  group of Lys<sup>365</sup> of  $\beta$ -TrCP. The phosphate group of pSer<sup>344</sup> makes two H-bonds  
 409 with the  $\epsilon\text{NH}$  group of Arg<sup>285</sup> and the OH of Ser<sup>325</sup> of  $\beta$ -TrCP. The carbonyl group of  
 410 Gly<sup>345</sup> forms an H-bond with the  $\epsilon\text{NH}$  of Arg<sup>474</sup> of  $\beta$ -TrCP. The carbonyl group of Ile<sup>346</sup>  
 411 makes H-bonds with the  $\epsilon\text{NH}$  of Arg<sup>474</sup> and the OH of Tyr<sup>438</sup> of  $\beta$ -TrCP. The  $\gamma$ -carbonyl  
 412 group of Asn<sup>349</sup> forms H-bonds with the  $\epsilon\text{NH}$  of Arg<sup>431</sup> and the OH of Ser<sup>448</sup> of  $\beta$ -TrCP.  
 413 Finally, the  $\gamma\text{NH}_2$  of Asn<sup>349</sup> makes one H-bond with the carbonyl group of Gly<sup>408</sup> of  $\beta$ -  
 414 TrCP. It is possible that pSer<sup>347</sup> could make H-bonds or ionic interactions with either the  
 415  $\epsilon\text{NH}$  groups of Arg<sup>521</sup> or Arg<sup>431</sup> of  $\beta$ -TrCP, but these contacts were not found in the  
 416 lowest energy structure.

417 In addition to H-bonds, hydrophobic contacts were observed. The side chain of  
 418 Ile<sup>346</sup> is stabilized in the hydrophobic pocket made by the aromatic rings of Phe<sup>523</sup> and  
 419 Tyr<sup>271</sup> and the guanidinium group of Arg<sup>521</sup> of  $\beta$ -TrCP. The side chain of Leu<sup>348</sup> is  
 420 stabilized in the hydrophobic central channel involving contacts with Ala<sup>434</sup> and Val<sup>395</sup>  
 421 on the WD40 propeller of  $\beta$ -TrCP. All these contacts appear to be essential and explain  
 422 the high stability of the 2P-hNrf2/ $\beta$ -TrCP complex.

423 *Ser residues in the Neh6 phosphodegron are necessary for the interaction with*  
424 *β-TrCP.* The contribution of individual residues to the association between Nrf2 and β-  
425 TrCP was examined using a pull-down assay. In the first set of experiments, HEK293T  
426 cells were co-transfected with expression vectors for Flag-tagged β-TrCP and either  
427 inactive GSK-3β<sup>Y216F</sup> or constitutively active GSK-3β<sup>Δ9</sup>. The cells were also co-  
428 transfected with mNrf2-V5 having intact Neh6 (wt) or Ser to Ala mutations at positions  
429 335 and 338 (2S/2A), 335, 338, 342 and 347 (4S/4A) or 335, 338, 342, 347, 351 and  
430 355 (6S/6A), as indicated in Fig. 5A. Cells were serum-starved for 16 h and kept in the  
431 presence of the proteasome inhibitor MG132 (40 μmol/l) for the last 3 h incubation.  
432 Nrf2 with an intact Neh6 domain associated with β-TrCP and this interaction was  
433 enhanced in the presence of active GSK-3β<sup>Δ9</sup>. By contrast, mutation of Ser<sup>335</sup> and Ser<sup>338</sup>  
434 in mNrf2 was sufficient to abolish this interaction. These results are consistent with the  
435 NMR data.

436 In a second set of experiments, we explored the contribution of certain Arg  
437 residues in the WD40 propeller of β-TrCP to the docking of mNrf2 (Fig. 5B).  
438 HEK293T cells were co-transfected with the expression vector for mNrf2-V5 and  
439 vectors encoding either wild-type or single point mutants of β-TrCP with substitutions  
440 of Arg<sup>285</sup>, Arg<sup>410</sup>, Arg<sup>431</sup>, Arg<sup>474</sup> or Arg<sup>521</sup> with Glu. Cells were serum-starved for 16 h  
441 and maintained in 40 μM MG132 for the last 3 h. Pull-down experiments showed that  
442 Arg<sup>285</sup>, Arg<sup>474</sup> and Arg<sup>521</sup> contributed to the docking of mNrf2 onto β-TrCP, whereas  
443 Arg<sup>410</sup> and Arg<sup>431</sup> did not appear to play a significant role. These results are consistent  
444 with our model of interaction based on the NMR data.

445 *In vivo effect of GSK-3β on Nrf2 activity.* To determine the relevance of the  
446 GSK-3/β-TrCP axis on regulation of Nrf2 stability, we analyzed Nrf2 function in the  
447 hippocampus of transgenic mice with a conditional neuron-specific depletion of GSK-

3 $\beta$  (denoted +Cre). Immunohistochemistry and Western blotting revealed a strong reduction in GSK-3 $\beta$  in +Cre mice compared to control mice (-Cre) (Fig. 6A and 6B). Quantitative determination of messenger RNA levels indicated a reduction of GSK-3 $\beta$  transcripts to about 20% relative to control mice, while GSK-3 $\alpha$  mRNA levels were unaffected (Fig. 6F). While GSK-3 $\beta$  protein levels were reduced to about 25% in +Cre mice, Keap1 and  $\beta$ -TrCP levels remained similar (Fig. 6C). By contrast, Nrf2 protein levels were increased in hippocampus of GSK-3 $\beta$  floxed mice compared to control mice (-Cre). Moreover, both the protein levels (Fig. 6D and 6E) and the mRNA levels (Fig. 6F and 6G) of phase 2 enzymes HO-1, GSTM5, GCLM and GCLC were increased in the GSK-3 $\beta$ -deficient hippocampi. These results demonstrate that interruption of the GSK-3/ $\beta$ -TrCP ubiquitination pathway at the level of GSK-3 $\beta$  results in up-regulation of Nrf2 and its target genes *in vivo*.

## DISCUSSION

Nrf2 can be regulated by cell signaling pathways, but the mechanisms involved are not understood. Herein, we describe a Keap1-independent mechanism by which Nrf2 is repressed that is based on its interaction with the SCF ubiquitin ligase adaptor  $\beta$ -TrCP. The binding of  $\beta$ -TrCP to Nrf2 involves the formation of a phosphodegron in the Neh6 domain of this transcription factor that is catalyzed by GSK-3, and it is therefore apparent that the process will be strongly influenced by signaling via PI3K and mTOR. Moreover, this mechanism is likely to be perturbed in a number of major diseases such as cancer, Alzheimer's disease and diabetes mellitus.

Mammalian Nrf2 comprises approximately 600 amino acids, of which more than 100 are serine, threonine and tyrosine (Figure A of supplemental material). The fact that Nrf2 is an unstable protein that contains so many putative phospho-sites

472 complicates the identification of phosphorylation events that might control its activity.  
473 To date, mass spectroscopy studies have identified phosphorylation sites that appear to  
474 have only a relatively minor role in the function of Nrf2. In order to map the sites in  
475 Nrf2 that are phosphorylated by GSK-3 we employed a reductionist approach that  
476 incorporated the following three strategies: i) creation of an EYFP-Neh6 fusion protein  
477 (EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>) in which the region of interest in Nrf2 was restricted to just 56  
478 residues; ii) site-directed mutagenesis of critical residues in Neh6; iii) use of 2D-PAGE  
479 to increase the resolution of phosphorylated and non-phosphorylated protein. This  
480 approach allowed us to detect two rows of electrophoretically distinct protein spots. The  
481 faster-migrating lower row of spots represented a post-translational modification in the  
482 fluorescent protein that is not related to Nrf2 since it was observed in non-chimeric  
483 EGFP (36). The slower-migrating upper row of electrophoretic spots correlated with  
484 phosphorylation of Neh6 because it disappeared when cell lysates were treated with  
485  $\lambda$ PPase. The identification of the slower migrating bands as phosphorylated protein is  
486 also supported by the fact that when cells were cotransfected with vectors for EYFP-  
487 mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 and the constitutively active GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$  kinase, at least two additional  
488 acidic spots were observed in the upper row of polypeptides that coincided with a  
489 reduced intensity of the most basic spot. When taken together, these results indicate that  
490 active GSK-3 $\beta$  increased the abundance of phosphorylated EYFP-mNrf2-V5.

491 Analysis of EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 mutants by 2D-PAGE indicated that Ser<sup>342</sup>  
492 and Ser<sup>347</sup> in mouse Nrf2, that are situated N-terminally to Pro residues, are  
493 phosphorylated under basal conditions, suggesting a role for Pro-directed Ser/Thr  
494 kinases in their modification. It is interesting that the double mutant lacking both Ser<sup>342</sup>  
495 and Ser<sup>347</sup> was still phosphorylated by GSK-3 $\beta$ , although to a lesser extent and with a

496 somewhat distorted pattern of spots. This result is consistent with a role for GSK-3 in  
497 phosphorylation of Ser<sup>335</sup> and Ser<sup>338</sup> within the DpSGIpS phosphodegron. Also, the fact  
498 that the most abundant spots in this mutant correspond to the unphosphorylated protein  
499 suggests that GSK-3 $\beta$  is more effective at phosphorylating this degron when Ser<sup>342</sup> and  
500 Ser<sup>347</sup> have already been phosphorylated. Indeed, it is known that GSK-3 exhibits  
501 preference for substrates that have been previously phosphorylated in the consensus  
502 sequence (S/T)X<sub>(1-4)</sub>p(S/T), where X is any amino acid and p(S/T) is a Ser/Thr residue  
503 that has been previously phosphorylated by some other “priming” kinase (21). We are  
504 currently seeking to identify the putative kinases that “prime” Ser<sup>342</sup> and Ser<sup>347</sup> in mouse  
505 Nrf2 for subsequent modification by GSK-3.

506 The E3 ligase substrate adaptor  $\beta$ -TrCP targets proteins such as Snail, I $\kappa$ B $\alpha$ ,  
507 I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ K $\epsilon$ , WEE1, CDC25A, CDC25B,  $\beta$ -catenin, PDC4, REST, ATF4, PRL-R,  
508 IFNR, p63, GHR, Bora, STAT1, Gli2, Gli3 and Xom for ubiquitination and  
509 proteasomal degradation (1, 8, 18, 22, 28-29, 44-45, 50-51). Many of these proteins are  
510 implicated in cell proliferation and it is tempting to speculate that Nrf2 activity is linked  
511 to proliferative signals through the GSK-3/ $\beta$ -TrCP axis. Thus, GSK-3 is inhibited by  
512 several kinases during cell proliferation, and this should result in upregulation of Nrf2  
513 that would in turn afford protection against increased levels of reactive oxygen species  
514 that are generated during cell cycle progression.

515 Our NMR studies indicate that the phosphodegron of Nrf2 is likely to possess a  
516 high degree of structure with a turn conformation which is found also in other substrates  
517 of  $\beta$ -TrCP (33). Our data suggest that the DpSGIpSLN motif that adopts the turn  
518 structure and contains phosphoserines pSer<sup>344</sup> and pSer<sup>347</sup> that play a specific role in the  
519 interaction. In contrast, the adjacent pSer<sup>351</sup> and pSer<sup>356</sup> residues may not be so  
520 important. This interpretation is consistent with the fact that in other substrates

521 recognized by  $\beta$ -TrCP, GSK-3 phosphorylates a cluster of Ser/Thr residues in the target  
522 protein to give the consensus sequence DpSGX<sub>(1-4)</sub>pS, which is then recognized by  $\beta$ -  
523 TrCP through its WD40 domain (7, 39).

524 The interaction of Nrf2 with  $\beta$ -TrCP was compared with that formed between  $\beta$ -  
525 catenin with  $\beta$ -TrCP. The Nrf2 phosphodegron in human Nrf2(<sup>343</sup>DpSGIpS<sup>347</sup>) is a  
526 single residue shorter than that of  $\beta$ -catenin (<sup>32</sup>DpSGIHpS<sup>37</sup>) and despite sequence  
527 similarity this fact changes the pattern of electrostatic and hydrophobic interactions and  
528 the residues involved. As shown in the superimposition of images presented in Fig. 4E,  
529 pSer<sup>344</sup> of the hNrf2 phosphodegron interacts in identical position to that reported for  
530 pSer<sup>33</sup> of the human  $\beta$ -catenin. However, the positions of other residues including the  
531 most C-terminal phosphoserines differ. Thus, Ile<sup>35</sup> of human  $\beta$ -catenin interacts with the  
532 central hydrophobic channel of the WD40 propeller of  $\beta$ -TrCP while Ile<sup>346</sup> of human  
533 Nrf2 interacts with another hydrophobic pocket (Phe<sup>523</sup>, Tyr<sup>271</sup> and Arg<sup>521</sup>) that is also  
534 responsible for stabilization of  $\beta$ -catenin. The role of Ile<sup>35</sup> of human  $\beta$ -catenin is  
535 assumed in human Nrf2 by Leu<sup>348</sup>. This residue appears to be essential for stabilization  
536 of the interaction the C-terminal phosphoserine (pSer<sup>347</sup>) with the WD40 propeller.

537 We hypothesize that three structural determinants stabilize the interaction of  
538 Nrf2 and  $\beta$ -catenin with  $\beta$ -TrCP. First, the phosphate group of the N-terminal  
539 phosphoserine makes H-bonds and ionic interaction with Arg<sup>285</sup> and Ser<sup>325</sup> of  $\beta$ -TrCP.  
540 Second, a hydrophobic residue close to the N-terminal phosphoserine (Ile<sup>346</sup> in Nrf2)  
541 interacts with the hydrophobic pocket formed by Phe<sup>523</sup>, Tyr<sup>271</sup> and Arg<sup>521</sup> of  $\beta$ -TrCP.  
542 Third, the interaction of a hydrophobic residue with the central channel of  $\beta$ -TrCP (Ile<sup>35</sup>  
543 in  $\beta$ -catenin or Leu<sup>348</sup> in Nrf2) should be preserved to allow the stabilization of the C-  
544 terminal phosphoserine with Arg<sup>431</sup> or Arg<sup>521</sup> of  $\beta$ -TrCP.



545 As an additional confirmation of our NMR data, we analyzed the association of  
546 mNrf2 and  $\beta$ -TrCP mutants in pull-down assays. Indeed, mutation of Ser<sup>335</sup> and Ser<sup>338</sup>  
547 of mNrf2 (equivalent to Ser<sup>344</sup> and Ser<sup>347</sup> of hNrf2) was enough to lose the association  
548 with  $\beta$ -TrCP. Moreover, Arg<sup>285</sup>, Arg<sup>474</sup> and Arg<sup>521</sup> of the WD40 domain of  $\beta$ -TrCP were  
549 required for docking because when they were mutated to Glu the association between  
550 Nrf2 and  $\beta$ -TrCP diminished substantially. These observations reinforce our  
551 interpretation of NMR data indicating a relevant role of these three residues in  
552 stabilization of docking: Arg<sup>258</sup> with pSer<sup>344</sup>; Arg<sup>474</sup> with Gly<sup>345</sup> and Ile<sup>346</sup>; Arg<sup>521</sup> with  
553 Ile<sup>346</sup> and possibly with pSer<sup>347</sup>.

554 The functional relevance of the control of Nrf2 by GSK-3/ $\beta$ -TrCP was addressed  
555 *in vivo*, by making use of mice with a targeted deletion of GSK-3 $\beta$  in neurons. We  
556 found that GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -TrCP is required to maintain low levels of Nrf2 and its phase 2  
557 regulated genes. Because GSK-3 $\beta$  has a tremendous impact on many aspects of cell  
558 physiology, metabolism, differentiation and proliferation, a more comprehensive vision  
559 of the Nrf2 function and regulation mechanisms will only be achieved when Nrf2 is  
560 analyzed as a downstream target of GSK-3 $\beta$ .

## 561 **ACKNOWLEDGEMENTS**

562 This work was supported by a MICINN grant SAF2010-18722 from the Spanish  
563 Ministry of Science and Innovation. Patricia Rada is contracted under the “Formación  
564 de Profesorado Universitario” program of the Spanish Ministry of Science and  
565 Innovation. We thank Jim Woodgett (Toronto) for mice and advice, and acknowledge  
566 funding and infrastructural support from EEC 7th Framework Program, KULeuven-  
567 Research Fund and KULeuven-Research&Development.

568

## 569 REFERENCES

- 570 1. **Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler.** 1997. beta-  
571 catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* **16**:3797-  
572 3804.
- 573 2. **Bax, A., and D. G. Davis.** 1985. MLEV-17-based twodimensional homonuclear  
574 magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **65**:355-360.
- 575 3. **Blanco, F. J., G. Rivas, and L. Serrano.** 1994. A short linear peptide that folds  
576 into a native stable beta-hairpin in aqueous solution. *Nat Struct Biol* **1**:584-590.
- 577 4. **Coadou, G., J. Gharbi-Benarous, S. Megy, G. Bertho, N. Evrard-Todeschi,**  
578 **E. Segeral, R. Benarous, and J. P. Girault.** 2003. NMR studies of the  
579 phosphorylation motif of the HIV-1 protein Vpu bound to the F-box protein  
580 beta-TrCP. *Biochemistry* **42**:14741-14751.
- 581 5. **Cullinan, S. B., J. D. Gordan, J. Jin, J. W. Harper, and J. A. Diehl.** 2004.  
582 The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3  
583 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* **24**:8477-  
584 8486.
- 585 6. **DeLano, W. L.** 2002. The PyMOL Molecular Graphics System, on World Wide  
586 Web. <http://www.pymol.org>.
- 587 7. **Feldman, R. M., C. C. Correll, K. B. Kaplan, and R. J. Deshaies.** 1997. A  
588 complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the  
589 phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**:221-230.
- 590 8. **Frescas, D., and M. Pagano.** 2008. Deregulated proteolysis by the F-box  
591 proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer*  
592 **8**:438-449.
- 593 9. **Furukawa, M., and Y. Xiong.** 2005. BTB protein Keap1 targets antioxidant  
594 transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell*  
595 *Biol* **25**:162-171.
- 596 10. **Hayes, J. D., and M. McMahon.** 2009. NRF2 and KEAP1 mutations:  
597 permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci*  
598 **34**:176-188.
- 599 11. **Hwang, T. L., and A. J. Shaka.** 1995. Water Suppression That Works -  
600 Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J*  
601 *Magn Reson* **112**:275-279.
- 602 12. **Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake,**  
603 **N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto, and Y. Nabeshima.**  
604 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II  
605 detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem*  
606 *Biophys Res Commun* **236**:313-322.
- 607 13. **Itoh, K., J. Mimura, and M. Yamamoto.** 2010. Discovery of the negative  
608 regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid Redox Signal*  
609 **13**:1665-1678.
- 610 14. **Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel, and**  
611 **M. Yamamoto.** 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant  
612 responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2  
613 domain. *Genes Dev* **13**:76-86.
- 614 15. **Jain, A. N.** 2003. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a  
615 molecular similarity-based search engine. *J Med Chem* **46**:499-511.

- 616 16. **Jaworski, T., I. Dewachter, B. Lechat, M. Gees, A. Kremer, D. Demedts, P.**  
617 **Borghgraef, H. Devijver, S. Kugler, S. Patel, J. R. Woodgett, and F. Van**  
618 **Leuven.** 2011. GSK-3alpha/beta kinases and amyloid production in vivo. *Nature*  
619 **480**:E4-5; discussion E6.
- 620 17. **Jazwa, A., A. I. Rojo, N. G. Innamorato, M. Hesse, J. Fernandez-Ruiz, and**  
621 **A. Cuadrado.** 2011. Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2  
622 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental  
623 parkinsonism. *Antioxid Redox Signal* **14**:2347-2360.
- 624 18. **Kanemori, Y., K. Uto, and N. Sagata.** 2005. Beta-TrCP recognizes a  
625 previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and  
626 Cdc25B phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:6279-6284.
- 627 19. **Kato, Y., K. Iida, M. I. Kang, A. Kobayashi, M. Mizukami, K. I. Tong, M.**  
628 **McMahon, J. D. Hayes, K. Itoh, and M. Yamamoto.** 2005. Evolutionary  
629 conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated  
630 degradation of the protein by proteasome. *Arch Biochem Biophys* **433**:342-350.
- 631 20. **Kobayashi, A., M. I. Kang, H. Okawa, M. Ohtsui, Y. Zenke, T. Chiba, K.**  
632 **Igarashi, and M. Yamamoto.** 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as  
633 an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2.  
634 *Mol Cell Biol* **24**:7130-7139.
- 635 21. **Kockeritz, L., B. Doble, S. Patel, and J. R. Woodgett.** 2006. Glycogen  
636 synthase kinase-3--an overview of an over-achieving protein kinase. *Curr Drug*  
637 *Targets* **7**:1377-1388.
- 638 22. **Latres, E., D. S. Chiaur, and M. Pagano.** 1999. The human F box protein beta-  
639 Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-  
640 catenin. *Oncogene* **18**:849-854.
- 641 23. **Linge, J. P., M. Habeck, W. Rieping, and M. Nilges.** 2003. ARIA: automated  
642 NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* **19**:315-316.
- 643 24. **Lo, S. C., X. Li, M. T. Henzl, L. J. Beamer, and M. Hannink.** 2006. Structure  
644 of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling.  
645 *EMBO J* **25**:3605-3617.
- 646 25. **McMahon, M., N. Thomas, K. Itoh, M. Yamamoto, and J. D. Hayes.** 2006.  
647 Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation  
648 of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the  
649 Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem* **281**:24756-24768.
- 650 26. **McMahon, M., N. Thomas, K. Itoh, M. Yamamoto, and J. D. Hayes.** 2004.  
651 Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein  
652 domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6  
653 degron. *J Biol Chem* **279**:31556-31567.
- 654 27. **Megy, S., G. Bertho, J. Gharbi-Benarous, N. Evrard-Todeschi, G. Coadou,**  
655 **E. Segal, C. Iehle, E. Quemeneur, R. Benarous, and J. P. Girault.** 2005.  
656 STD and TRNOESY NMR studies on the conformation of the oncogenic protein  
657 beta-catenin containing the phosphorylated motif DpSGXXpS bound to the beta-  
658 TrCP protein. *J Biol Chem* **280**:29107-29116.
- 659 28. **Pan, Y., C. B. Bai, A. L. Joyner, and B. Wang.** 2006. Sonic hedgehog  
660 signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing  
661 and degradation. *Mol Cell Biol* **26**:3365-3377.
- 662 29. **Papkoff, J., and M. Aikawa.** 1998. WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta  
663 activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem*  
664 *Biophys Res Commun* **247**:851-858.

- 665 30. **Piotto, M., V. Saudek, and V. Sklenar.** 1992. Gradient-tailored excitation for  
666 single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* **2**:661-  
667 665.
- 668 31. **Pons, J., N. Evrard-Todeschi, G. Bertho, J. Gharbi-Benarous, V. Sonois, R.**  
669 **Benarous, and J. P. Girault.** 2007. Structural studies on 24P-IkappaBalpha  
670 peptide derived from a human IkappaB-alpha protein related to the inhibition of  
671 the activity of the transcription factor NF-kappaB. *Biochemistry* **46**:2958-2972.
- 672 32. **Pons, J., N. Evrard-Todeschi, G. Bertho, J. Gharbi-Benarous, V. Tanchou,**  
673 **R. Benarous, and J. P. Girault.** 2008. Transfer-NMR and docking studies  
674 identify the binding of the peptide derived from activating transcription factor 4  
675 to protein ubiquitin ligase beta-TrCP. Competition STD-NMR with beta-catenin.  
676 *Biochemistry* **47**:14-29.
- 677 33. **Pons, J., V. Tanchou, J. P. Girault, G. Bertho, and N. Evrard-Todeschi.**  
678 2011. NMR applications for identifying beta-TrCP protein-ligand interactions.  
679 *Mini Rev Med Chem* **11**:283-297.
- 680 34. **Rada, P., A. I. Rojo, S. Chowdhry, M. McMahon, J. D. Hayes, and A.**  
681 **Cuadrado.** 2011. SCF/{beta}-TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-  
682 dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent  
683 manner. *Mol Cell Biol* **31**:1121-1133.
- 684 35. **Rojo, A. I., N. G. Innamorato, A. M. Martin-Moreno, M. L. De Ceballos, M.**  
685 **Yamamoto, and A. Cuadrado.** 2010. Nrf2 regulates microglial dynamics and  
686 neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Glia* **58**:588-598.
- 687 36. **Rojo, A. I., O. N. Medina-Campos, P. Rada, A. Zuniga-Toala, A. Lopez-**  
688 **Gazcon, S. Espada, J. Pedraza-Chaverri, and A. Cuadrado.** 2012. Signaling  
689 pathways activated by the phytochemical nordihydroguaiaretic acid contribute to  
690 a Keap1-independent regulation of Nrf2 stability: Role of glycogen synthase  
691 kinase-3. *Free Radic Biol Med* **52**:473-487.
- 692 37. **Rojo, A. I., M. R. Sagarra, and A. Cuadrado.** 2008. GSK-3beta down-  
693 regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to  
694 exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem* **105**:192-202.
- 695 38. **Rushmore, T. H., and A. N. Kong.** 2002. Pharmacogenomics, regulation and  
696 signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug*  
697 *Metab* **3**:481-490.
- 698 39. **Skowyra, D., K. L. Craig, M. Tyers, S. J. Elledge, and J. W. Harper.** 1997.  
699 F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF  
700 ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**:209-219.
- 701 40. **States, D. J., R. A. Haberkorn, and D. J. Ruben.** 1982. A two-dimensional  
702 nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four  
703 quadrants. *J Magn Reson* **48**:286-292.
- 704 41. **Taguchi, K., H. Motohashi, and M. Yamamoto.** 2011. Molecular mechanisms  
705 of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*  
706 **16**:123-140.
- 707 42. **Tong, K. I., A. Kobayashi, F. Katsuoka, and M. Yamamoto.** 2006. Two-site  
708 substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch  
709 mechanism. *Biol Chem* **387**:1311-1320.
- 710 43. **Venugopal, R., and A. K. Jaiswal.** 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos  
711 and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated  
712 expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S*  
713 *A* **93**:14960-14965.

714 44. **Wang, B., and Y. Li.** 2006. Evidence for the direct involvement of {beta}TrCP  
715 in Gli3 protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:33-38.

716 45. **Watanabe, N., H. Arai, Y. Nishihara, M. Taniguchi, T. Hunter, and H.**  
717 **Osada.** 2004. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of  
718 somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:4419-4424.

719 46. **Willker, W., D. Leibfritz, R. Kerssebaum, and W. Bermel.** 1993. Gradient  
720 Selection in Inverse Heteronuclear Correlation Spectroscopy. *Magn Reson*  
721 *Chem* **31**: 287-292.

722 47. **Wu, G., G. Xu, B. A. Schulman, P. D. Jeffrey, J. W. Harper, and N. P.**  
723 **Pavletich.** 2003. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex:  
724 destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1)  
725 ubiquitin ligase. *Mol Cell* **11**:1445-1456.

726 48. **Wüthrich, K.** 1986. *NMR of Proteins and Nucleic Acids.* John Wiley & Sons,  
727 New York.

728 49. **Zhang, D. D., S. C. Lo, J. V. Cross, D. J. Templeton, and M. Hannink.** 2004.  
729 Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent  
730 ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* **24**:10941-10953.

731 50. **Zhou, B. P., J. Deng, W. Xia, J. Xu, Y. M. Li, M. Gunduz, and M. C. Hung.**  
732 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in  
733 control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* **6**:931-940.

734 51. **Zhu, Z., and M. Kirschner.** 2002. Regulated proteolysis of Xom mediates  
735 dorsoventral pattern formation during early *Xenopus* development. *Dev Cell*  
736 **3**:557-568.

737

738

## 739 FIGURES LEGENDS

740 Figure 1. Mapping the Nrf2 domain involved in interaction with  $\beta$ -TrCP. A,  
 741 diagram showing the general organization of the Neh domains in Nrf2 according to (14)  
 742 and the EYFP-mNrf2-V5 chimeras used in pull-down assays with N-terminal deletions  
 743 of mNrf2. Each chimera carries the following residues from mNrf2:  $\Delta 1$ , 98-579;  $\Delta 2$ ,  
 744 280-579;  $\Delta 3$ , 316-579;  $\Delta 4$ , 381-579;  $\Delta 5$ , 464-579. Black boxes indicate the position of  
 745 Ser/Thr clusters that might be phosphorylated by GSK-3 (see Figure A of Supplemental  
 746 Material for details). B, Ribbon diagram of the E3 ligase adaptor  $\beta$ -TrCP (modified  
 747 from protein data bank ID 1P22; (47)) showing the substrate binding domain, WD40  
 748 propeller, in red and the Skp1 binding domain, Fbox, in blue. C and D, pull-down assays  
 749 of ectopically expressed EYFP-mNrf2-V5 chimeras and  $\beta$ -TrCP $^{\Delta Fbox}$ -HA which  
 750 contains only the WD40 domain (residues 170 to 542 of  $\beta$ -TrCP2). HEK293T cells  
 751 were co-transfected with expression vectors for the indicated EYFP fusion proteins,  $\Delta 1$ ,  
 752  $\Delta 2$ ,  $\Delta 3$ ,  $\Delta 4$ , and  $\Delta 5$ , and  $\beta$ -TrCP $^{\Delta Fbox}$ . Thereafter, the cells were maintained in low-  
 753 serum medium (0.5 % FCS in DMEM) for 16 h and analyzed by co-  
 754 immunoprecipitation. C, immunoblots showing inputs of ectopically expressed  $\beta$ -  
 755 TrCP $^{\Delta Fbox}$ -HA and EYFP-mNrf2-V5 proteins with anti-HA and anti-V5 antibodies,  
 756 respectively. D, immunoprecipitation of EYFP-mNrf2-V5 fusion chimeras with anti-V5  
 757 antibody followed by immunoblot with either anti-HA antibody to detect  $\beta$ -TrCP $^{\Delta Fbox}$ -  
 758 HA, or with anti-V5 antibody to detect EYFP-mNrf2-V5 chimeras.

759 Figure 2. The Neh6 domain is phosphorylated by GSK-3 $\beta$ . A, on the left side  
 760 immunoblots, HEK293T cells were transfected with expression vectors for EYFP-  
 761 mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 and mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372) 6S/6A</sup>-V5. Cell lysates were incubated  
 762 with  $\lambda$ PPase as indicated and resolved by one-dimensional SDS-PAGE. Upper panel,  
 763 immunoblot with anti-V5 antibody. Lower panel, immunoblot with anti- $\beta$ -actin

antibody to check equal protein loading. On the right side immunoblots, HEK293T cells were co-transfected with expression vectors for EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 and mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372)6S/6A</sup>-V5 together with either inactive HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup>, as a negative control, or constitutively active HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>. Upper panel, immunoblot with anti-V5 antibody. Lower panel, immunoblot with anti-HA antibody. B, comparison of mNrf2 sequences from wild-type and mutant EYFP chimeras examined in panels C-H. C, 2D-PAGE analysis of EYFP-mNrf2<sup>(317-372)</sup>-V5 in the presence of either inactive HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup> or active HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>. D, same lysates as in C after treatment with  $\lambda$ PPase. E-H, 2D-gel analysis of mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372)6S/6A</sup>-V5 (E), mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372)4S/4A</sup>-V5 (F), mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372)2SP/2AP</sup>-V5 (G) and mutant EYFP-mNrf2<sup>(317-372)2S/2A</sup>-V5 (H), in the presence of inactive HA-GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup> or active HA-GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>. In C, G and H, filled arrows indicate acidic spots that result from GSK-3 phosphorylation. Empty arrow indicates spots whose intensity is reduced in the presence of HA-GSK3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup> as a result of protein migration towards that acidic spots.

**Figure 3.** Structure analysis of 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2. A, sequence of 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2 phosphopeptides from human Nrf2; for reference of amino acid positions, the mouse Nrf2 sequence is also shown. In addition, the human  $\beta$ -catenin sequence is included for comparison. B, values of the temperature coefficients of the amide proton chemical shifts (ppb·K<sup>-1</sup>) for the 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2 peptides at pH 7.2 plotted against the residue number. C, chemical shift differences for the NH resonances of the 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2 peptides free in buffer solution and in the presence of MBP- $\beta$ -TrCP at 280 K and pH 7.2, plotted against the residue number. D, relative STD intensities for 2P-hNrf2 and 4P-hNrf2 peptides. The integral values of the largest signal for the 2P-hNrf2 peptide (pSer<sup>331</sup> HN proton) and for the 4P-hNrf2 peptide (pSer<sup>328</sup> HN proton) were set to 100 %. The relative degree of saturation for the individual protons



789 normalized to the largest signal was used to compare the STD effect. E, effect of  
790 temperature (280 K or 293 K) on the relative STD intensities for 4P-hNrf2. The integral  
791 value of the largest signal of the 4P-Nrf2 (pSer<sup>328</sup> HN proton) was set to 100% at 280 K.  
792 A correction factor of 0.85 was applied on STD values obtained at 293 K.

793 Figure 4. TRNOE-derived structures of the 2P-hNrf2 peptide bound to  $\beta$ -TrCP  
794 and analysis of the docking interactions. A, Among 50 TRNOEs derived structures, the  
795 five lowest energy conformations are shown. Superimpositions are shown on the  
796 DpSGIpS motif. B, Nrf2 docked structure (light green) superimposed with the TRNOE  
797 bound structure (dark green) on the DpSGIpS motif. Phosphoserine residues are  
798 labelled in red in the docked structure and black in the TRNOE structure. C, seven  
799 lowest score poses that are representative of the bound structures of Nrf2. The  
800 superimposition was made on the DpSGIpS motif. D, structure of the complex of  $\beta$ -  
801 TrCP with the best docking pose of Nrf2 deduced from the NMR data.  $\beta$ -TrCP is shown  
802 in surface representation. Amino acids of  $\beta$ -TrCP and Nrf2 that participate in  
803 intermolecular interactions are shown in black and white letters, respectively. H-bonds  
804 are shown with dashed yellow lines. E, superimposition of human Nrf2 (green) and  
805 human  $\beta$ -catenin (orange) in the best docking structures of the complexes with  $\beta$ -TrCP  
806 (PDB ID code 1P22).

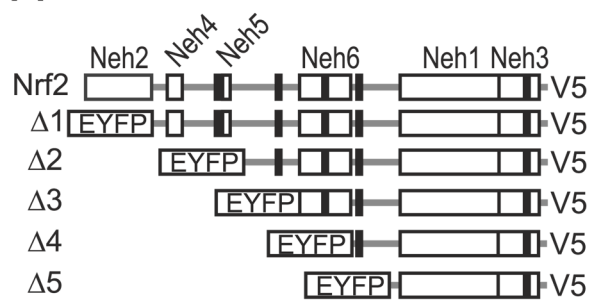
807 Figure 5. Identification of critical residues for Nrf2 docking onto  $\beta$ -TrCP by  
808 pull-down assays. A, HEK293T cells were co-transfected with Flag-tagged  $\beta$ -TrCP,  
809 HA-tagged GSK-3 $\beta$ <sup>Y216F</sup> and GSK-3 $\beta$  <sup>$\Delta$ 9</sup>, as indicated, plus V5-tagged mouse Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup>  
810 with either a wild-type Neh6 domain (wt) or mutations of Ser<sup>335</sup> and Ser<sup>338</sup> to Ala  
811 (2S/2A), or Ser<sup>335</sup>, Ser<sup>338</sup>, Ser<sup>342</sup> and Ser<sup>347</sup> to Ala (4S/4A), or Ser<sup>335</sup>, Ser<sup>338</sup>, Ser<sup>342</sup>,  
812 Ser<sup>347</sup>, Ser<sup>351</sup> and Ser<sup>355</sup> to Ala (6S/6A). Cells were maintained in low serum for 16 h

813 and treated with 40  $\mu$ M MG132 for the last 3 h before pull-down of protein complexes  
814 with anti-V5 antibodies. B, HEK293T cells were co-transfected with V5-tagged tagged  
815 Nrf2 <sup>$\Delta$ ETGE</sup> and Flag-tagged  $\beta$ -TrCP with either a wild-type WD40 domain or single  
816 point mutations of Arg to Glu at the indicated residues. Cells were maintained in low  
817 serum for 16 h and treated with 40  $\mu$ M MG132 for the last 3 h before the pull-down  
818 assay was performed.

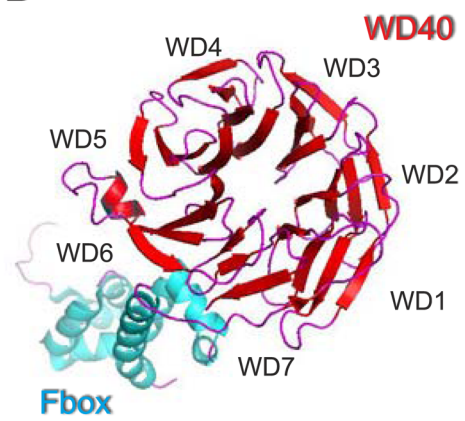
819 Figure 6. GSK-3 $\beta$  deficiency results in increased expression of Nrf2-target  
820 genes. A, immunohistochemistry of 30- $\mu$ m-thick hippocampal sections from control  
821 mice (-Cre) with normal GSK-3 $\beta$  levels and in neuron-specific GSK-3 $\beta$  knockout mice  
822 (+Cre). Upper panels, anti-GSK-3 $\beta$  antibody staining and Nissl counterstaining. Lower  
823 panels, higher magnification of the CA1 region of hippocampus. B, immunoblots  
824 showing protein levels of GSK-3 $\beta$ , Nrf2, Keap1,  $\beta$ -TrCP and  $\beta$ -actin. C, densitometric  
825 quantification of protein levels from representative blots like those of B normalized  
826 with  $\beta$ -actin levels. D, immunoblots showing protein levels of five enzymes whose  
827 expression is regulated by Nrf2 (heme oxygenase-1, HO-1; glutathione S-transferase  
828 M5, GSTM5;  $\gamma$ -glutamyl cysteine ligase modulatory subunit, GCLM;  $\gamma$ -glutamyl  
829 cysteine ligase catalytic subunit, GCLC). E, densitometric quantification of protein  
830 levels from representative blots like those of D. F, messenger RNA levels in  
831 hippocampus of GSK-3 $\beta$  and GSK-3 $\alpha$  in control mice and in neuron specific GSK-3 $\beta$   
832 knockout mice, determined by quantitative RT-PCR. G, messenger RNA levels of HO-  
833 1, GSTM5, GCLM, GCLC and NQO1, by RT-PCR. For C, E, F and G values  
834 correspond to the mean  $\pm$  SEM of n=6 animals per group. Student's *t* test was applied to  
835 determine the significance of biochemical differences among groups. Asterisks denote  
836 significant differences between genotypes with  $p < 0.05$ .

837

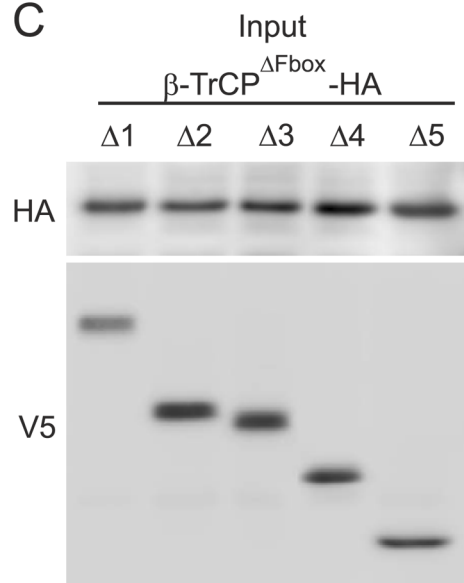
**A**



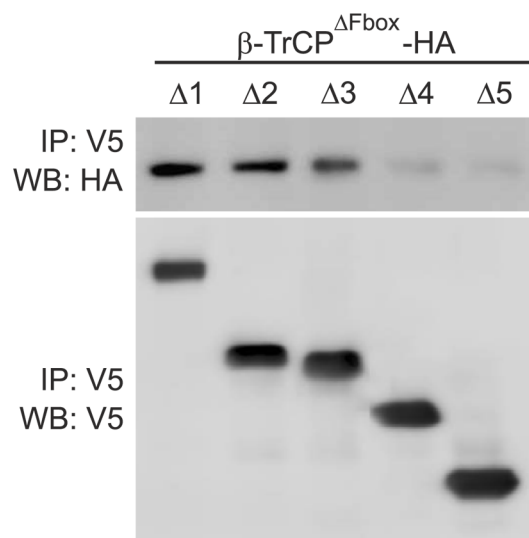
**B**

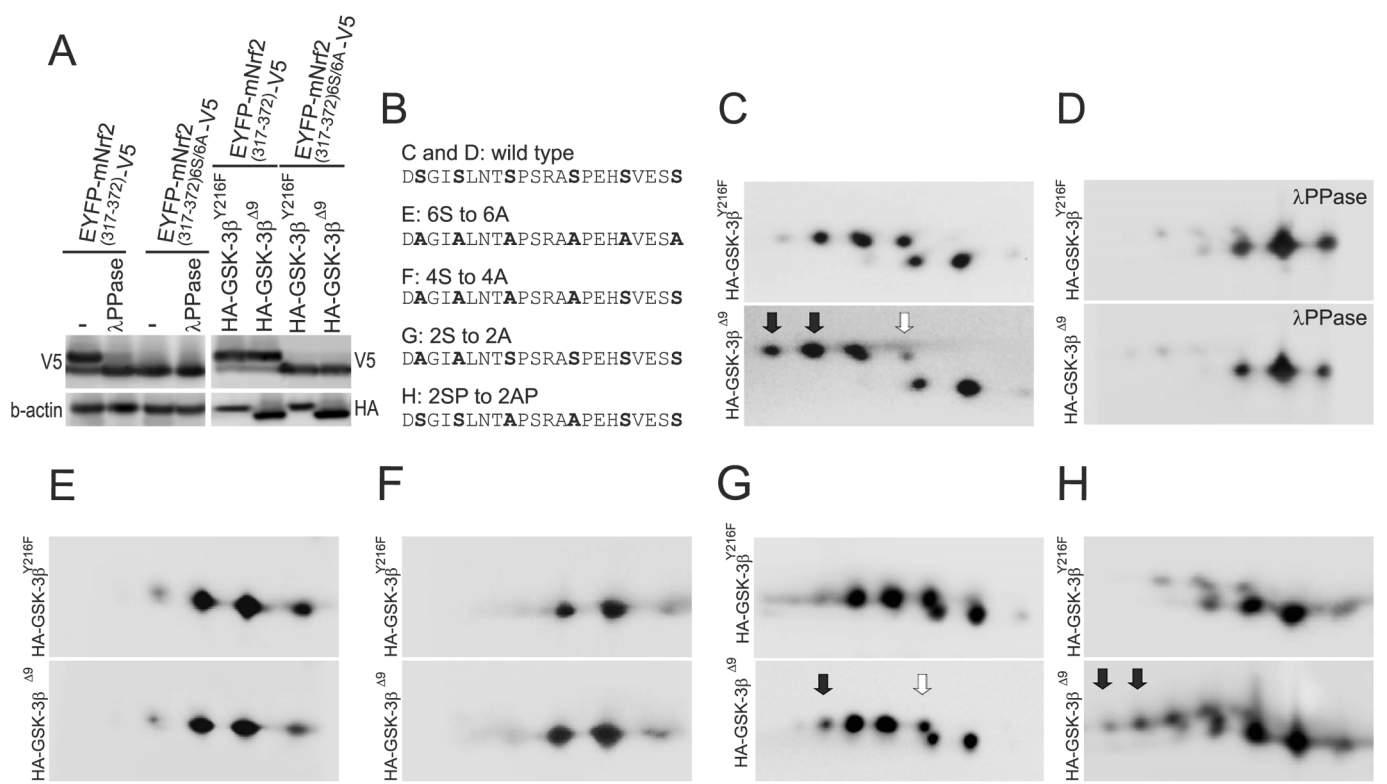


**C**



**D**

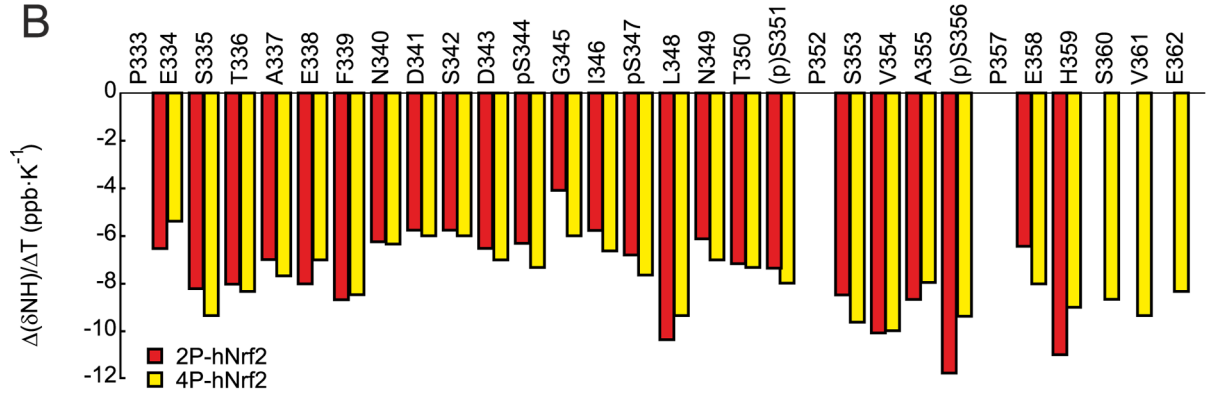




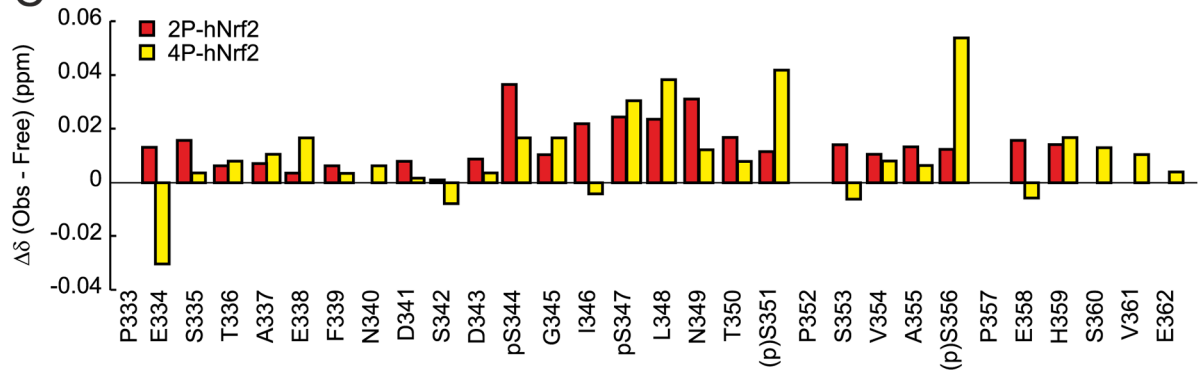
A

mNrf2: 324-AEGTMEFNDSD<sup>335</sup>SGI<sup>338</sup>SLNT<sup>342</sup>SPSRAS<sup>347</sup>PEHSVE-353  
hNrf2: 333-PESTA<sup>344</sup>EFNDSD<sup>347</sup>SGI<sup>351</sup>SLNT<sup>356</sup>SPSVAS<sup>356</sup>PEHSVE-362  
2P-hNrf2: PESTA<sup>344</sup>EFNDSD<sup>347</sup>SGI<sup>351</sup>SLNT<sup>356</sup>SPSVASPEH  
4P-hNrf2: PESTA<sup>344</sup>EFNDSD<sup>347</sup>SGI<sup>351</sup>SLNT<sup>356</sup>SPSVASPEHSVE  
hβ-catenin: 22-VSHWQQQSYLD<sup>33</sup>SGIH<sup>37</sup>SGATTAPSLSGKGN-51

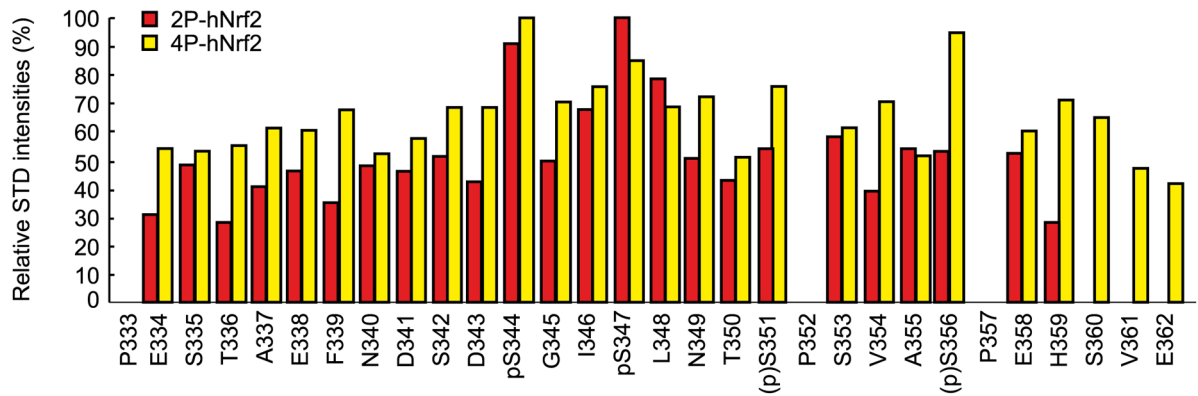
B



C



D



E

